

Bakalářská práce

Klonování, exprese a charakterisace mutantů lidské serinracemasy

Bachelor thesis

Cloning, expression and characterization of human serine racemase mutants

Ilona Nováková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.



Katedra biochemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Výzkumné centrum Gilead Sciences & IOCB
Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 4. 6. 2010

.....

Ilona Nováková

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za přijetí do své laboratorní skupiny a za jeho cenné rady a připomínky. Ráda bych také poděkovala Hillary Hoffman, která mi velmi pomohla s prvními krůčky v laboratoři a která mě zasvětila do tajů lidské serinracemasy. Velký dík patří Janě Jiráskové, bez jejíž pomoci by tato práce nikdy nevznikla. Velký dík jí také patří za to, že mi připomněla, že požádat o pomoc není hřích a že bez pomoci ostatních se člověk někdy neobejde. Děkuji také všem mým kolegům z laboratoře za vytvoření příjemného a inspirujícího pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, bez jejichž lásky a podpory by tato práce jen těžko vznikala.

Obsah

ABSTRACT.....	6
ABSTRAKT	7
SEZNAM ZKRATEK	8
1. TEORETICKÝ ÚVOD	10
1.1. Původ a funkce D-serinu.....	10
1.1.1. D-serin jako neuromodulátor	10
1.1.2. D-serin jako produkt enzymu serinracemasy	11
1.1.3. D-serin a neuropatologie	12
1.2. Enzymy závislé na pyridoxal-5'-fosfátu	13
1.2.1. Evoluční původ a zařazení PLP-enzymů do strukturních skupin.....	13
1.2.2. Mechanismus reakcí katalyzovaných enzymy závislými na PLP	14
1.3. Aminokyselinové racemasy	17
1.3.1. Alaninracemasa a mechanismus reakce	18
1.3.2. Aspartátracemasa	19
1.3.3. Prokaryotická serinracemasa.....	20
1.4. Eukaryotická serinracemasa.....	20
1.4.1. SR u rostlin	22
1.4.1.1. SR dvouděložných rostlin: <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
1.4.1.2. SR jednoděložných rostlin: <i>Hordeum vulgare</i> a <i>Oryza sativa</i>	22
1.4.2. SR u kvasinek	22
1.4.2.1. SR ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.4.2.2. SR ze <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	23
1.4.3. Savčí SR.....	24
1.4.3.1. SR z <i>Rattus norvegicus</i>	24
1.4.3.2. SR z <i>Mus musculus</i>	25
1.4.3.3. SR z <i>Homo sapiens</i>	25
2. CÍLE	29
3. MATERIÁL A METODY	30
3.1. Materiály	30
3.1.1. Chemikálie, média, enzymy a další použitý materiál.....	30
3.1.2. Oligonukleotidy	31
3.1.3. Plasmidová DNA	31
3.1.4. Programy.....	32
3.2. Přístroje.....	32
3.3. Metody	33
3.3.1. Polymerasová štěpná reakce (PCR)	33
3.3.2. Transformace bakterií <i>E. coli</i>	34

3.3.3. Minipreparace plasmidové DNA	34
3.3.4. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas	34
3.3.5. Horizontální agarosová elektroforéza	35
3.3.6. Měření koncentrace a čistoty DNA.....	35
3.3.7. Sekvenování DNA	36
3.3.8. Příprava média pro nadprodukci rekombinantního proteinu.....	36
3.3.9. Nadprodukce rekombinantního proteinu v <i>E. coli</i> (kmen MC1061).....	36
3.3.10. Purifikace rekombinantního hSR na Ni-NTA kolonce	37
3.3.11. Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu.....	38
3.3.12. Dialýza	39
3.3.13. Koncentrování proteinu po purifikaci	39
3.3.14. Měření koncentrace proteinu podle Bradfordové.....	39
3.3.15. Měření enzymové aktivity	39
3.3.15.1. Inkubace.....	39
3.3.15.2. Prekolonová derivatizace a RP-HPLC	40
3.3.16. Analýza tepelné stability proteinu.....	41
3.3.17. Gelová permeační chromatografie na koloně.....	41
4. VÝSLEDKY	43
4.1. Klonování rekombinantní hSR.....	43
4.2. Nadprodukce a purifikace rekombinantní hSR S84G	44
4.3. Měření enzymové aktivity	45
4.3.1. Porovnání aktivity WT hSR I a II	46
4.3.2. Měření racemizační aktivity hSR S84G.....	47
4.3.3. Měření eliminační aktivity hSR S84G	48
4.4. Měření tepelné stability hSR S84G.....	49
4.5. Stanovení multimerizace hSR S84G v roztoku.....	50
5. DISKUSE.....	53
6. ZÁVĚR.....	56
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57

Abstract

Human serine racemase (hSR) is a cytosolic pyridoxal-5'-phosphate dependent enzyme localized in the central nervous system. It synthesizes D-serine, which is an endogenous coagonist for the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and plays a key role in excitatory neurotransmission in the brain. Thus, human serine racemase is a promising target for the treatment of neurodegenerative diseases connected with NMDA receptors. However, few specific inhibitors have been identified to date and the crystal structure of hSR has become available only very recently. We decided to perform a random mutagenesis to determine the amino acid residues critical for the enzyme activity. Ser 84 was reported as a catalytic residue along with Lys 56. After analysis of a double mutant S84G/P111L which retained its capability to convert L-serine to pyruvate, we prepared and characterized the single mutant S84G in order to exclude potential effect of the P111L mutation on the activity of the analyzed enzyme.

Key words: D-serine; Serine racemase; PLP-dependent enzymes; Random mutagenesis; Racemases

Abstrakt

Lidská serinracemasa (hSR) je cytosolický enzym využívající pyridoxal-5'-fosfát, který je lokalizován v centrální nervové soustavě. Syntetizuje D-serin, aminokyselinu, jež je endogenním koagonistou *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů a hraje tak v mozku klíčovou roli v excitační neurotransmisi. Lidská serinracemasa je tudíž slibným cílem při léčbě neurodegenerativních onemocněních spojených s NMDA receptory. Zatím však bylo identifikováno jen málo specifických inhibitorů a krystalová struktura hSR byla vyřešena teprve nedávno. Rozhodli jsme se tedy pomocí náhodné mutagenese určit aminokyselinové zbytky klíčové pro aktivitu enzymu. O zbytku Ser 84 je známo, že se spolu s Lys 56 podílí na katalýze. Poté, co jsme analyzovali mutanta S84G/P111L lidské serinracemasy, který si zachovával schopnost konvertovat L-serin na pyruvát, jsme syntetizovali a charakterizovali mutantní hSR S84G, abychom mohli vyloučit případný vliv mutace P111L.

Klíčová slova: D-serin; Serinracemasa; Enzymy závislé na PLP; Mutagenese; Racemasy

Seznam zkratek

A β	β -amyloidní peptid
ALS	amyotrofní laterální skleróza
AMP, ATP	adenosinmonosfát, adenosintrifosfát
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
AR	alaninracemasa
BLAST	z angl. Basic Local Alignment Search Tool
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CCD	z angl. charge-coupled device
cDNA	kódující DNA (z angl. coding DNA)
Da	daltony
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DNPH	dinitrofenylhydrazin
DR	aspartátracemasa
DTT	dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	z angl. Enzyme Commission
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FDA	1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alanin amid (Marfeyho činidlo)
GOT	glutamát-oxaloacetát transaminasa
GRIP-1	protein interagující s glutamátovým receptorem (z angl. glutamate receptor interacting protein)
HEPES	kyselina N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová]
hSR	lidská serinracemasa (z angl. human serine racemase)
kDa	1000 Daltonů (z angl. kilo Daltons)
K_M	Michaelisova konstanta
mRNA	mediátorová RNA
mSR	myší serinracemasa
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PICK1	protein interagující s kinasou C (z angl. protein interacting with

	C-kinase
PDB	Databáze proteinů (z angl. Protein Data Bank)
PDZ doména	PSD-95/Disc-large/Zo-1 doména
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PLP-enzym	enzym závislý na PLP
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází (z angl. reverse phase high performance liquid chromatography)
spSR	serinracemasa z kvasinky <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulphate)
SR	serinracemasa
TBA	hydroxid tetrabutylamonný
TEA	triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky
w/v	hmotnost látky v konečném objemu roztoku (z angl. weight for volume)

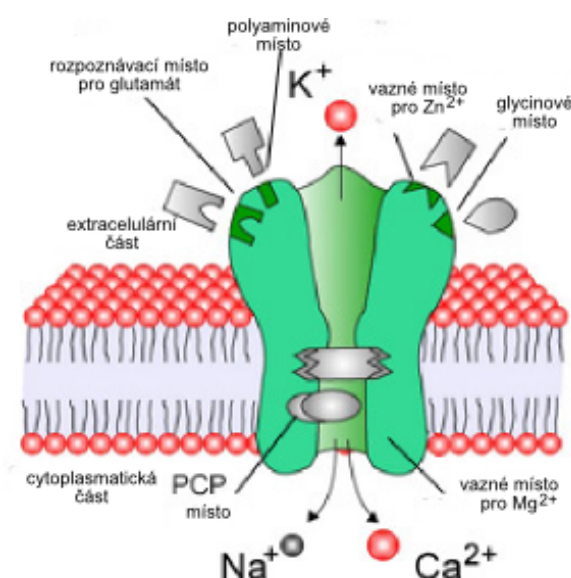
1. Teoretický úvod

1.1. Původ a funkce D-serinu

1.1.1. D-serin jako neuromodulátor

L-aminokyseliny jsou nejen základními stavebními kameny proteinů, ale jsou i důležitými intermediáty v metabolických procesech. Dlouho se věřilo, že jejich stereoisomery, D-aminokyseliny, se nevyskytují v eukaryotech, nýbrž jen v bakteriích, kde jsou součástí peptidoglykanové vrstvy buněčné stěny.

Již v 80. letech dvacátého století Kleckner a Dingledine poukázali na to, že D-serin je stejně účinný ligand *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA) jako glycin [1]. Tehdy tomu ale nikdo nevěnoval pozornost, protože D-aminokyseliny byly považovány jen za „nepřirodní“ isomery a buněčné artefakty. Zlom nastal asi před dvaceti lety, kdy se podařilo dokázat přítomnost D-alaninu [2], D-aspartátu [3] a také D-serinu (DS) v savčím mozku [4]. To odstartovalo velký zájem o D-serin jako o fyziologický neuromodulátor. Snyder a kolegové prokázali, že D-serin se nachází ve velkém množství právě v místech s vysokým výskytem NMDA receptorů [5].



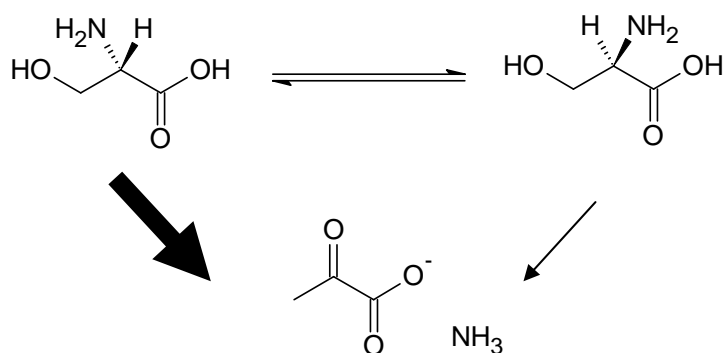
Obr. 1 Znázornění NMDA receptoru-iontového kanálu. Je vyobrazen s vaznými místy pro glutamát a glycín/D-serin a s ionty, které propouští. Obrázek převzat z www.frca.co.uk/images/NMDA.jpg.

NMDA receptory se nacházejí v nervových synapsích. Jsou to glutamátové receptory - iontové kanály hrající klíčovou roli v excitační neurotransmisi. Účastní se důležitých procesů jako je synaptická plasticita, která se pokládá za model vzniku paměti [6]. Tyto receptory tvoří heterotetramery a skládají se ze dvou druhů podjednotek, NR1 a NR2. NR2 podjednotka nese vazné místo pro glutamát. K tomu, aby NMDA receptory mohly zprostředkovat transfer iontů přes buněčnou membránu (**obr. 1**, str.10), vyžadují navázání dalšího ligandu, tzv. „koagonisty“, jehož vazné místo se nachází na NR1 podjednotce. Navázání koagonisty navíc zvyšuje afinitu NMDA receptoru ke glutamátu [7].

1.1.2. D-serin jako produkt enzymu serinracemasy

Dlouho zůstávalo záhadou, odkud se D-serin v mozku bere. Již v roce 1965 Meister a kolegové předložili důkazy o syntéze D-serinu v eukaryotech, u bource morušového [8]. Ale až téměř o čtyřicet let později se Esakimu a kolegům podařilo dokázat přímou syntézu D-serinu enzymem serinracemasou, kterou izolovali z kukly bource morušového, *Bombyx mori* [9]. Nedlouho po tomto objevu se skupině S. Snydera podařilo purifikovat serinracemasu (SR) ze savčího organismu, z šedesáti krysích mozků [10]. I v mozku je D-serin syntetizován pomocí SR, enzymem využívajícím pyridoxal-5'-fosfát (PLP-enzym) [10-11]. SR kromě racemizace katalyzuje také β -eliminaci serinu za vzniku pyruvátu a amoniaku [12] (**obr. 2**, str.12).

SR je lokalizována jak v cytoplasmě astrocytů, buněk, jež se nacházejí v blízkosti nervových synapsí, tak v samotných neuronech [13]. Aktivita SR *in vivo* je regulována interakcí s jinými proteiny, například s proteinem interagujícím s glutamátovým receptorem (z angl. glutamate receptor interacting protein) (GRIP-1), s proteinem členem podrodiny Golgin A (Golga3) a s proteinem interagujícím s kinasou C (PICK1) [14-16]. GRIP-1 a PICK1 se váží přes svoji PSD-95/Disc-large/Zo-1 (PDZ) doménu na C-konec SR [14, 16] a jsou odpovědní za fyziologickou aktivaci SR. Je zajímavé, že krysí SR je na rozdíl od myší a lidské na C-konci zkrácena a postrádá tuto interakci [17]. Tato skutečnost poukazuje na to, že regulace SR se liší druh od druhu. V každém proteinu je délka jeho „života“ silně ovlivněna ubiquitinylací a proteasomální degradací. Ani SR není výjimkou. Právě Golga3 snižuje rychlost ubiquitinylačního procesu, a tak výrazně prodlužuje délku „života“ SR.



Obr. 2 Reakce katalyzované SR. LS je přeměňován na DS a naopak. Velikost šipek ukazuje, že LS podstupuje β -eliminaci za vzniku pyruvátu a amoniaku v mnohem větším rozsahu než DS.

1.1.3. D-serin a neuropatologie

Je možné, že se DS podílí na neurotoxicitě glutamátu, ke které dochází při nadměrné aktivaci NMDA receptorů. Dochází tak až ke smrti dotyčného neuronu způsobující nenávratné poškození mozku. NMDA receptory se staly důležitým farmakologickým cílem a jsou vyvíjeny inhibitory i blokátory jejich vazebných míst. Ačkoli se tyto látky dobře osvědčily u zvířecích modelů, u lidí vyvolávaly vedlejší účinky jako např. halucinace [18]. Příčinou může být nadměrné blokování receptorů, které způsobilo změny v normální neurotransmisí [19].

Naopak snížená aktivace NMDA receptorů může vést až ke schizofrenii [20]. Výsledky měření ukazují, že schizofrenici mají v krvi a cerebrospinální tekutině méně DS než zdraví jedinci [21-23]. Zatím se ale nepodařilo dokázat jednoznačné spojení mezi SR, nižší hladinou DS a schizofrenií.

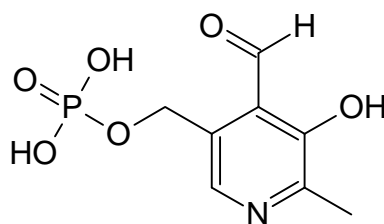
D-Serin a SR jsou dále spojovány s Alzheimerovou chorobou. Ukázalo se, že β -amyloidní peptid (A β), hlavní součást amyloidových plaků, zvyšuje koncentrace D-serinu, a tak ovlivňuje funkci NMDA receptorů [24]. Nedávno Inoue a kol. ukázali, že toxicita způsobovaná A β je výrazně snížena u myši s geneticky odstraněnou SR [25]. Nabídli tak SR jako nový potenciální cíl farmakologického zásahu u Alzheimerovy choroby.

Nejnověji vyšlo najevo, že u myších modelů amyotrofni laterální sklerózy (ALS) se hladina D-serinu zvyšuje s postupující chorobou, čemuž odpovídá také vysoká exprese SR v gliových buňkách míchy. Po přidání inhibitoru SR ke kultuře míšních gliových buněk izolovaných z myši nakažených ALS se toxicita NMDA receptorů snížila [26].

1.2. Enzymy závislé na pyridoxal-5'-fosfátu

Katalytická aktivita velkého množství enzymů je ovlivněna nebílkovinnou složkou [27], nazývanou kofaktor. Kofaktorem enzymů mohou být jak ionty anorganických sloučenin, například zinečnaté či hořečnaté ionty, tak nízkomolekulární organické sloučeniny. Jedním z nejrozšířenějších organických kofaktorů je pyridoxal-5'-fosfát (PLP) (**obr. 3**). PLP vzniká fosforylací pyridoxalu, který spolu s pyridoxinem a pyridoxaminem tvoří funkční deriváty vitamínu B₆.

PLP je nejenom velmi rozšířeným, ale i velmi všestranným katalyzátorem. Enzymová komise eviduje na 140 reakcí katalyzovaných PLP-enzymy, což odpovídá 4% všech známých enzymových aktivit. PLP katalyzuje přenos NH₂ skupiny, dekarboxylaci, racemizaci či eliminaci. Až na jednu výjimku, kterou je glykogen fosforylasa (viz. dále), je v molekule PLP aktivní funkční skupinou aldehyd, který reaguje s aminy. Proto jsou PLP-enzymy důležité pro přeměnu aminokyselin.



Obr. 3 Struktura pyridoxal-5' - fosfátu.

1.2.1. Evoluční původ a zařazení PLP – enzymů do strukturních skupin

V prebiotickém světě byl metabolismus organismů s největší pravděpodobností ovládán pouze kofaktory [28], kolem kterých se následně vyvinuly složitější struktury. Od kofaktoru tedy odvozujeme evoluční původ samotných apoenzymů. Tak PLP-enzymy nacházíme u všech říší organismů. Nynější studie ukazují, že tyto enzymy byly vybaveny reakční a substrátovou specifitou dlouho před vznikem živočišných říší. PLP-enzymy tak mohou být studovány nezávisle na fylogenetické divergenci [29].

Ačkoli jsou PLP-enzymy funkčně rozmanité, existuje několik druhů skupin, podle kterých můžeme tyto enzymy zařadit. Christen a kolegové [30] definovali tři rodiny (α , β a γ) podle uhlíku hlavního řetězce substrátu, na kterém se v průběhu enzymatické reakce odehrávají změny. Jansonius a kol. rozřadili PLP-enzymy do pěti skupin (Fold Type I-V) na základě podobnosti jejich terciárních struktur [31]. Nedávno byly ovšem objeveny dvě

další skupiny [32] VI a VII. Nejnověji Christen a kol. zavedli čtyři nezávislé rodiny paralogních proteinů využívajících PLP: rodinu α , největší a funkčně nejrozmanitější, rodinu β , strukturně nejvíce homogenní, a rodiny D-alanin aminotransferasy a alanin racemasy. V této práci využívám rozdělení podle terciární struktury proteinů.

Většina PLP-enzymů spadá strukturně do skupiny I. Řadíme sem aminotransferasy, dekarboxylasy a enzymy katalyzující α -, β - a γ -eliminace. Nejznámějším a zároveň nejprozkoumanějším zástupcem této skupiny je aspartát aminotransferasa, podle které se skupina někdy nazývá. Tyto enzymy vytváří funkční homodimery, někdy však i mnohem rozsáhlejší komplexy. Každý dimer obsahuje dvě aktivní místa, která jsou lokalizována na rozhraní mezi dvěma podjednotkami dimeru. Tyto podjednotky jsou složeny z velké a malé domény a obě poskytují stejný podíl aminokyselinových zbytků aktivnímu místu.

Enzymy skupiny II, takzvané tryptofan synthasové rodiny, jsou velmi podobné struktuře enzymů ze skupiny I. Vytváří homodimery, ale liší se podobou aktivního místa, které je složeno z aminokyselinových zbytků jen jednoho z monomerů [33]. Tyto enzymy navíc obsahují regulační doménu.

Enzymy skupiny III tvoří také homodimery s podjednotkami tvořenými dvěma doménami. Rozdíl je patrný až ve způsobu vazby PLP, kdy PLP se natáčí svou *re* stranou k proteinu. Typickým zástupcem této skupiny je eukaryotická ornithin dekarboxylasa.

Skupina IV se strukturně podobá skupině I. Nicméně, aktivní místo je zrcadlovým obrazem aktivního místa skupiny I [34] a odráží tak substrátovou specifitu enzymů, které vážou D-aminokyseliny. D-aminokyselinová aminotransferasa je jedním z mála zástupců této skupiny.

Skupina V obsahuje glykogen fosforylasy, které sice využívají PLP ke katalytickým účelům, avšak liší se tím, že účastníkem katalytické reakce je fosfátová skupina PLP.

Racemasy závislé na PLP spadají do tří skupin I, II a III. Usuzuje se tedy, že se racemasy vyvinuly z nejméně tří různých předků [35]. Alaninracemasa izolovaná z hub patří do skupiny I, bakteriální alaninracemasa do skupiny III a konečně eukaryotická serinracemasa patří do skupiny II.

1.2.2. Mechanismus reakcí katalyzovaných enzymy závislými na PLP

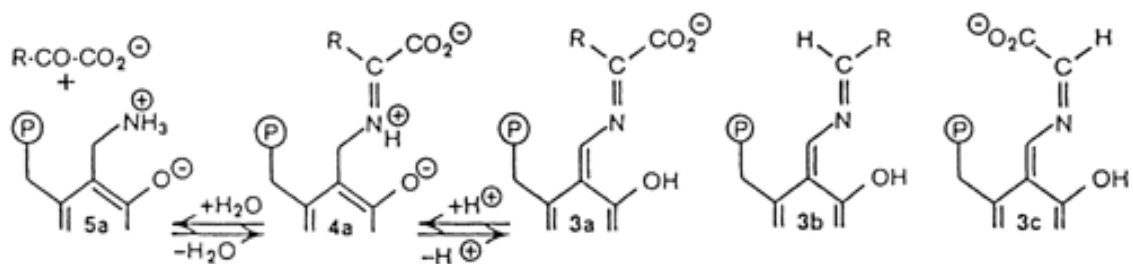
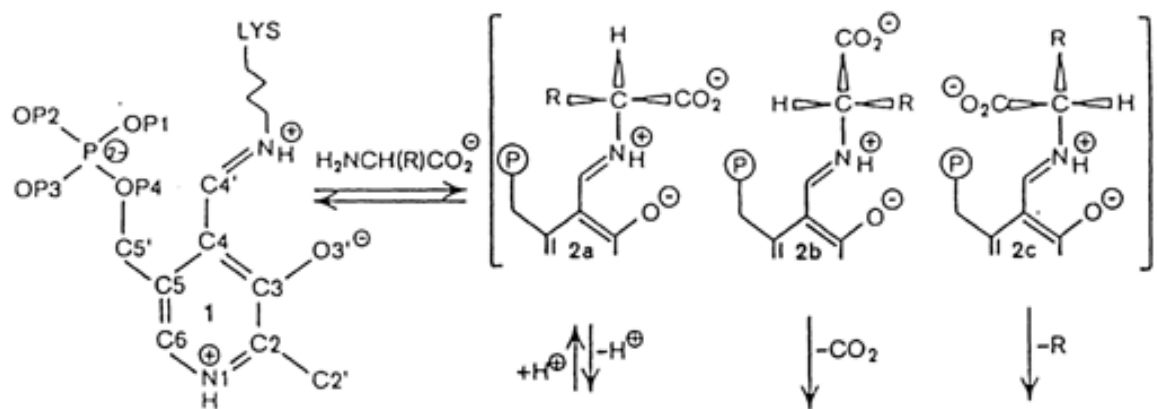
PLP má dvě důležité vlastnosti, které hrají klíčovou roli v průběhu chemických reakcí se substráty. Má jednak schopnost díky své aldehydové skupině vytvářet iminy s NH_2 skupinou aminokyselin. Dále je schopen odjímat substrátu elektrony („electron

sink“). V klidovém stavu je PLP vázán v aktivním místě přes Schiffovu bázi (vnitřní aldimin) na lysinový zbytek. Prvním a společným krokem všech reakcí katalyzovaných PLP-využívajícími enzymy je výměna ϵ -aminové skupiny lysinu za aminovou skupinu substrátu za vzniku vnějšího aldiminu (**obr. 4**, str.16). Díky vzniku Schiffovy báze může PLP a jeho pyridinový kruh svým π -systémem oslabovat těsně sousedící σ -vazby.

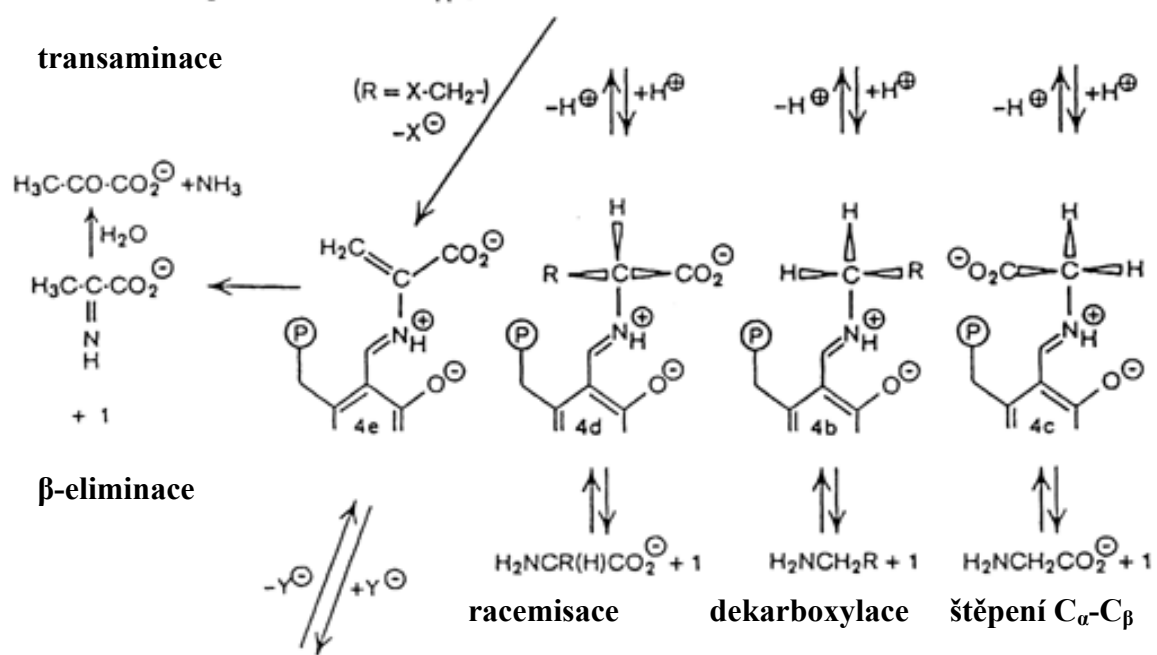
Dalším krokem je štěpení některé z vazeb vycházející z α -uhlíku za vzniku karbanionu jako intermediátu. π -systém PLP zajišťuje stabilitu takto vzniklého intermediátu - chinonoidu, jež je dána resonanční strukturou mezi kruhem pyridinu a Schiffovou bází. Nedávné studie ukázaly, že Schiffova báze, respektive poloha sdíleného protonu mezi fenolovou skupinu PLP a Schiffovou bází, stojí za stabilizací přechodového stavu [36]. Nejvýhodnější z hlediska stabilizace přechodového stavu je protonace dusíku na Schiffově bází, tudíž sdílený proton musí být na něho formálně navázán. Právě v chinonoidní resonanční struktuře tkví síla katalytických schopností PLP.

Jak je ale zajištěna reakční specifita enzymů závislých na PLP? Samotné zvýšení delokalizační energie přechodového stavu [37] nestačí k rozbití správné σ -vazby. Vazba, určená ke štěpení, musí zaujímat správnou konformaci v prostoru [38]. Tudíž jen vazby, které leží v rovině kolmo na rovinu Schiffovy báze/ π -systém pyridinu, se budou štěpit. To znamená, že když je v této pozici umístěn například atom vodíku, jeho σ -vazba s α -uhlíkem se oslabí a budeme pozorovat reakce jako transaminace, β -eliminace, dekarboxylace či racemizace.

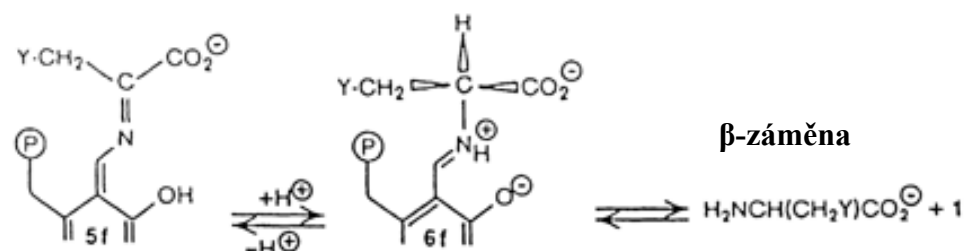
Správná konformace substrátu v aktivním místě je kontrolována apoenzymem. Aminokyselinové zbytky váží karboxylátový anion a molekula substrátu se pak může otáčet pod taktovkou stereoelektronických efektů kofaktoru PLP. Jak bylo zmíněno výše, jedna správná konformace vyústí ve vícero reakcí. Enzym musí mít mechanismus, kterým minimalizuje nechtěné postranní reakce a zároveň upřednostní reakci, pro kterou je určen. Jedním z možných způsobů je rozmístění aminokyselinových zbytků okolo komplexu PLP-substrát, které budou svými postranními řetězci ovlivňovat průběh reakce. Například bakteriální alaninracemasa (AR) reaguje jen se substráty, které nemohou podstoupit eliminaci, a tak možnou postranní reakcí je pouze transaminace. V blízkosti pyridinového dusíku je umístěn zbytek argininu [39], jež svým pozitivním nábojem zabráni protonaci PLP, tím PLP není schopno pohlcovat elektrony a sníží se delokalizační energie. Proběhne jen racemizace, protože nevyžaduje tak vysoký stupeň delokalizace elektronové hustoty jako transaminace.



transaminace



β -eliminace



β -záměna

Obr. 4 (str.16) Mechanismus reakcí katalyzovaných PLP, struktura **1** představuje vnitřní aldimin složený z PLP a lysinu. Po reakci s NH_2 skupinou aminokyseliny vzniká vnější aldimin **2**. Transaminace vede cestou přes **2a**, **3a**, **4a** až hydrolyzou vzniká **5a**. K racemizaci dochází přes **3a**, který může být reprotonovaný z opačné strany a dát vzniknout **4d** a následně D-aminokyselině. β a γ eliminace mají také počátek v **3a** a vzniká aminoakrylátový intermediát **4e**. Reprotonace a transaminace vyústí v **1** a sekundární imin, který následně hydrolyzuje na amoniak a pyruvát. β - záměna přidává na $\text{C}\beta$ skupinu Y^- a dává vznik chinonoidnímu intermediátu **5f**, který po reprotonaci poskytuje vnější aldimin **6f**. α dekarboxylace probíhá přes **2b**, **3b** a poskytuje vnější aldimin **4b**. Štěpení vazby $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ začíná u **2c** a spolu s tetrahydrofolátem přes **3c** dává vznik **4c**. Schéma bylo upraveno z [31].

Naopak je tomu tedy u transaminas, jako např. aspartát aminotransferasy (AAT), kde se místo argininu nachází aspartát udržující pyridinový dusík v protonované formě, který tak dopomáhá k vysoké delokalizační energii. Transaminasa AAT, stejně jako bakteriální AR, reaguje se substráty nepodstupujícími eliminace. Reakce, které se musí enzym vyhnout, respektive zmenšit riziko, je racemizace. AAT nabízí elegantní řešení. Ve chvíli, kdy se naváže substrát do aktivního místa, se enzym kolem substrátu sevře a zabráni tak přístupu molekulám vody, které by jinak protonovaly *re* stranu chinonoidního intermediátu [40] a dopomáhaly k racemizaci. Zatím není jasné zda tato uzavřená konformace ovlivňuje také substrátovou specifitu, ale faktem zůstává, že reakční specifita je výrazně podpořena.

1.3. Aminokyselinové racemasy

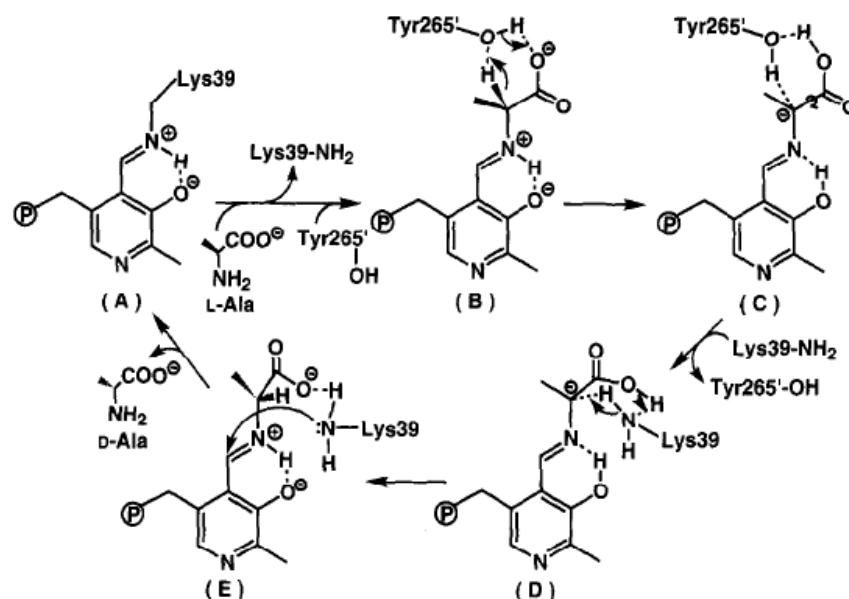
V roce 1937 byla objevena schopnost enzymatické racemizace u bakterií mléčného kvašení. Od té doby objevy různých druhů racemas jen narůstají. Racemasy byly dokázány u bakterií, archaebakterií i eukaryot. Dělíme je na dvě hlavní skupiny: racemasy závislé na PLP a racemasy, které ke své aktivitě PLP nevyužívají. Mezi racemasy nevyužívající PLP řadíme glutamát racemasu a bakteriální aspartát racemasu. D-glutamát a D-aspartát jsou součástí peptidoglykanových vrstev bakteriálních buněčných stěn a jsou produkovány ze svých L-analogů právě těmito racemasami. Pro enzymovou aktivitu těchto racemas jsou nezbytné cysteinové zbytky v aktivním místě. Tyto racemasy však nejsou předmětem této práce. Mezi PLP-racemasy řadíme alanin racemasu, dále eukaryotickou aspartát racemasu a nakonec racemasu serinovou.

1.3.1. Alaninracemasa a mechanismus reakce

D-alanin se nachází v buněčných stěnách bakterií. Je hlavní molekulou pro sbalení peptidoglykanové vrstvy a pro její propojení. Enzym katalyzující racemizaci L-alaninu na D-analog se nazývá alaninracemasa (AR) a jak již bylo zmíněno výše, patří do skupiny I PLP-enzymů. Alaninracemasa byla izolována z různých druhů bakterií. Dva geny, které kódují dvě odlišné AR, byly nalezeny u *Salmonella typhimurium* [41], *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a u *Vibrio cholerae*. Genomy ostatních druhů bakterií obsahují vždy jen po jednom genu AR, jak ukazuje genomová databáze [42]. Kromě bakterií se AR našla také u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* [43]. Její AR vykazuje vysokou podobnost s AR gram-negativní γ -proteobakterií. Usuzuje se tedy, že kvasinka získala kódující gen pro AR horizontálním genovým přenosem, nejpravděpodobněji konjugací.

Krystalografické studie AR z *Bacillus stearothermophilus* ukázaly, že AR využívá dva aminokyselinové zbytky Lys 39 a Tyr 265' (čárka značí, že zbytek náleží druhému z monomerů) jako katalytické báze [39, 44] pro abstrakci α -vodíku ze substrátu na intermediát a následnou tvorbu buď D-alaninu [45-46] či L-alaninu. Původní hypotéza o transferu α -protonu mezi Lys 39 a Tyr 265' se nepotvrdila, protože se ve struktuře enzymu nenašly ani molekuly vody ani aminokyselinové zbytky, které by tento přenos mohly zprostředkovat. Tudíž Watanabe a kol. [47] přišli s návrhem, že karboxylová skupina substrátu se přímo účastní katalýzy tím, že napomáhá transferu α -protonu mezi katalytickými bázemi (**obr.5**, str.19). Hydroxylová skupina Tyr 265' odjímá α -proton z komplexu aldimin-PLP- L-alanin a následně ho předá karboxylové skupině. Karboxylová skupina proton postoupí Lys 39, který ho vrátí nazpět $C\alpha$ za vzniku komplexu D-alanyl-PLP aldiminu. Výhodou tohoto mechanismu je, že jak amino skupina Lys 39, tak fenolová -OH skupina Tyr 265' si po celou dobu katalýzy zachovávají svoji neionizovanou formu a neztrácí tak své nukleofilní vlastnosti. Další výhodou je, že proton na karboxylové skupině stabilizuje strukturu karbanionu.

D-alanin nebyl nalezen jen u bakterií, ale stopové množství D-alaninu bylo objeveno také v myším mozku a v séru [2]. Zatímco původ D-alaninu v séru je odvozován od intestinálních bakterií, původ D-alaninu v mozku nebyl zatím objasněn.



Obr. 5 Mechanismus katalýzy alaninracemasy. Schéma převzato z [48].

1.3.2. Aspartátracemasa

D-aspartát byl dlouho znám ve formě aminokyselinového zbytku vázaného v proteinech. Tyto D-aspartylové zbytky jsou považovány za známky stárnutí proteinů a jejich přítomnost je fatální pro strukturu a funkci proteinu. Například nahromadění D-aspartátu v proteinech oční čočky, jež je pozorováno při šedém zákalu, nebo výskyt D-aspartátu v β -amyloidových proteinech v mozku při Alzheimerově chorobě.

Zatímco volný D-aspartát byl poprvé izolován z mořské řasy *Chondria armata* v roce 1959 [49], zpráva o purifikaci samotného proteinu aspartátracemasy se objevila až v roce 2003. Shibata a kol. enzym extrahovali ze škeble *Scapharca broughtonii*, jejíž svalstvo obsahuje vysoký podíl D-aspartátu [50]. Na rozdíl od aspartátracemas izolovaných z archaebakterií, tato aspartátracemasa (DR) obsahuje PLP a mohla by tak by patřit do skupiny II PLP-enzymů [51]. Zjistilo se, že některé nukleotidy jako adenosinmonofosfát (AMP) či adenosintrifosfát (ATP) ovlivňují její enzymovou aktivitu. D-aspartát je využíván při anaerobním metabolismu. Je uchováván ve formě L-analogu, proto je DR pro tohoto živočicha nepostradatelná.

Mezitím byl volný D-aspartát objeven také v savcích organismech. Je lokalizován především v mozku, nadledvinkách a varlatech. D-aspartát v mozku je agonistou glutamátového místa NMDA receptorů a zdá se, že ovlivňuje vývoj nově vzniklých neuronů v mozku dospělců. Neurony postrádající DR nejsou schopny normálního dendritického rozvětvení a nemůžou tak integrovat existující nervový systém [52]. Nyní se podařilo naklonovat a exprimovat savčí DR, která přeměňuje L-aspartát na D-aspartát. Její

výskyt koresponduje s lokalizací D-aspartátu [52]. Savčí DR je PLP-dependentní enzym. Fylogeneticky je více spjata s cytosolickou a mitochondriální glutamát-oxaloacetát transaminasou (GOT) než se serinracemasou. I GOT je schopna v malé míře vytvářet D-aspartát během transaminace L-glutamátu na L-aspartát. V případě mutace aminokyselinového zbytku W140H a R292K je produkce D-aspartátu dokonce zvýšena. Trp 140 totiž zabraňuje přístupu donoru protonu a zamezuje tak průběhu racemizace. U savčí DR je Arg 292 nahrazen glutaminem a Trp 140 lysinem, který, stejně jako histidin, může přímo poskytnout svůj proton pro racemizační reakci.

1.3.3. Prokaryotická serinracemasa

Bakteriální serinracemasa byla objevena ve spojitosti s resistencí na určitá antibiotika jako je vancomycin. Toto antibiotikum inhibuje syntézu buněčné stěny. Váže se na petidoglykanové prekursory, respektive na karboxylové skupiny D-alaninových zbytků [53]. Tato rezistence je charakteristická pro bakterie rodu *Enterococcus*. Byly popsány tři fenotypy rezistence, VanA a VanB, kde bakterie syntetizují D-laktát [54] namísto koncového D-alaninu, a VanC, jehož buněčné stěny obsahují D-Ala-D-Ser místo obvyklé sekvence D-Ala-D-Ala. D-serin je v bakterii produkován serinracemasou (VanT) [55]. Tento enzym tvoří homodimer a je svými důležitými aminokyselinovými zbytky nápadně podobný alaninracemase, jeho C-terminální doména vykazuje 31% podobnost s AR z *B. stearothermophilus*. Tak Lys 39 u AR je ztotožnitelný s Lys 371 u VanT a Tyr 265' (AR) je u VanT Tyr 597. Mechanismus, kterým probíhá katalýza u VanT, je pravděpodobně podobný mechanismu AR.

1.4. Eukaryotická serinracemasa

K dnešnímu dni bylo objeveno a charakterizováno několik eukaryotických serinracemas. Ačkoli nedávno byla izolována PLP-dependentní serin/threonin racemasa z anaerobní hypertermofilní Archae *Pyrobaculum islandicum* [56] vykazující 26% sekvenční identitu s lidskou SR, je důležité si uvědomit, že se eukaryotické SR liší od prokaryotických AR a SR. Sekvenční identita mezi serinracemasami z různých druhů se pohybuje od 35% do 91%.

HomSap (1) -----MCAQYCI**S**FADVEKAHINIRDSIHLTPVLTSSILNQLTGRNLF**F**KCELFQK---
 MusMus (1) -----MCAQYCI**S**FADVEKAHINIQDSIHLTPVLTSSILNQIAGRNLF**F**KCELFQK---
 RatNor (1) -----MCAQYCI**S**FADVEKAHLNIQDSVHLTPVLTSSILNQIAGRNLF**F**KCELFQK---
 AraTha (1) -----MEANREKYAADIL**S**IKEAHDRIKPYIHRTPVLTSES**L**NSISGRSL**F**F**K**CECLQKGIE
 HorVul (1) MGSRDDDGHSTEGQGYAAD**I**NSIREARARIAPYVHK**T**PIL**S**TSIDAIAGQL**F**F**K**CECFQK---
 SchPom (1) -----MSDNLVLP**T**YDDVASASERIKKFANK**T**PVLT**S**STVNKEFVAEV**F**F**K**CENFQK---
 SacCer (1) -----MIVP**T**YGDVLDAS**N**RIKEYV**N**K**T**PVLT**S**RMLNDRLGAQ**I**Y**F**KGENFQK---

HomSap (52) -----TGSEKIRGALNAVRS**L**VPDALERKP**K**AVVTHSSGNHGQALTYAAKLEGIPAYI
 MusMus (52) -----TGSEKIRGALNAIRGLIPDTPEEK**K**AVVTHSSGNHGQALTYAAKLEGIPAYI
 RatNor (52) -----TGSEKIRGALNAIRGLIPDTLEG**K**AVVTHSSGNHGQALTYAAKLEGIPAYI
 AraTha (58) CRSFYFSVYCGKSGAEK**F**RGACNAVLSLD**A**EQ---AAKGVVTHSSGNHAAALSLAAKIQGIPAYI
 HorVul (63) -----AGAEKIRGASNSIFALDD**S**Q---AAKGVVTHSSGNHAAALVALAAKLRGIPAYI
 SchPom (53) -----MGAEKIRGALNAL**S**QLNEAQ---RKAGVLT**F**SSGNHAAQAI**A**LSAKILGIPAKI
 SacCer (49) -----VGA**K**FRGAMNAV**S**KLSD**E**K---RSKGVIA**F**SSGNHAAQAI**A**LSAKLLNV**P**ATI

HomSap (105) VVPQT**A**FDCKKLAIQAYGASIVYCEPSDESRENVAKRVTEETEGIMVHPNQEP**A**VIAGQGTIALE
 MusMus (105) VVPQT**A**FNCKKLAIQAYGASIVYCDPSDESREKVTQIRIMQETEGILVHPNQEP**A**VIAGQGTIALE
 RatNor (105) VVPQT**A**FNCKKLAIQAYGASIVYSEPSDESRENVAQRIIQETEGILVHPNQEP**A**VIAGQGTIALE
 AraTha (120) VVPKG**A**PKCKVDNVIRYGGKVIWSEATMSSRE**E**IASKVLQETGSVLHPYNDGR**I**ISGGQGTIALE
 HorVul (113) V**I**PKNA**E**ACKVENVRRYGGQV**I**WSDVT**M**ESRESIAKKVQ**E**ETGA**I**LHPFNDKY**T**ISGGQGTVCLE
 SchPom (103) **I**MP**L**DA**E**AKVAATKG**Y**GGQVIMYDRYKDDRE**K**MAKEISEREGL**T**I**P**PYDHPVLAGQGTAAKE
 SacCer (99) **V**MP**E**DA**E**AL**K**IAATAGYGAH**I**IRYNRY**T**EDRE**Q**IG**R**QLAA**E**HGFAL**I**PPYDHPDVIAGQGTSAKE

HomSap (170) VLNQVPLVDALVVPVGGGGMLAGIAITVKALKPSVKVYAAEP**S**NADDCYQ**S**KLKGK**L**MPNLYPPE
 MusMus (170) VLNQVPLVDALVVPVGGGGMVAGIAITIKALKPSVKVYAAEP**S**NADDCYQ**S**KLKGELTPNLHPPE
 RatNor (170) VLNQVPLVDALVVPVGGGGMVAGIAITIKTLKPSVKVYAAEP**S**NADDCYQ**S**KLKGELTPNLHPPE
 AraTha (185) LLEQ**I**QEIDATVVPISGGGLISGVALAAKS**I**KPSIRITAAEPKGADDAQ**S**KVAGKIT**T**-LPVTN
 HorVul (178) LLEQVPEID**T**IIVPISGGGLISGVTLAAKAIN**P**SIRILAAEPKGADDS**A**Q**S**KAAGR**I**IK-LPAT**S**
 SchPom (168) LFEEVG**P**LDALFVCLGGGGLISGSALAA**R**HFA**P**NCEVYGV**E**PEAGNDGQ**S**FRKGSIVH-ID**T**PK
 SacCer (164) LLEEVGQ**L**DALFVPLGGGGLISGSALAA**R**SL**S**PGCKIFGV**E**PEAGNDGQ**S**FR**S**GSIVH-INT**P**K

HomSap (235) TIADGVK-SSIGLNTWP**I**IRD**L**VDD**I**FTVTEDEIKCATQLVWERM**K**LLIEPTAGVGVA**A**VL**S**QH**F**
 MusMus (235) TIADGVK-SSIGLNTWP**I**IRD**L**VDD**V**FTVTEDEIKYATQLVWGRM**K**LLIEPTAGVALAAVL**S**QH**F**
 RatNor (235) TIADGVK-SSIGLNTWP**I**IRD**L**VDD**V**FTVTEDEIKYATQLVWERM**K**LLIEPTAGVG**L**AAVL**S**QH**F**
 AraTha (249) TIADGLR-ASLGDLTPVVRDLVDD**V**VTLEEC**E**IEAMKMCY**E**ILKVSE**P**SGAIG**L**AAVL**S**NS**F**
 HorVul (242) TIADGLR-AFLGDLTPVVRDLVDD**V**IVVD**N**AIVDAMKMCY**E**TLKVAV**E**PSGAIG**L**AAAL**S**DE**F**
 SchPom (232) TIADGAQTQHLGN**T**FS**I**IEKEVDD**I**LTVSD**E**ELIDCLKFYAARM**K**IVVE**P**TGCL**S**FAAAR**A**M**K**E
 SacCer (228) TIADGAQTQHLG**E**Y**T**FA**I**IRE**N**VDD**I**LTVSD**Q**ELV**K**CMHF**L**AERM**K**VVVE**P**TAC**L**GFAG**L**L**K**KE

HomSap (299) QT**V**S--PEVKN**I**CIVLSGGNV**D**LTS**S**ITWV**K**QAERPASYQSV**S**V
 MusMus (299) QT**V**S--PEVKN**V**CIVLSGGNV**D**LTS-LNVWGQAERPAPYQTV**S**V
 RatNor (299) QT**V**S--PEVKN**I**CIVLSGGNV**D**LTS-LSWV**K**QAERPAP-----
 AraTha (313) RNNP**S**CRDCKNIGIVLSGGNV**D**LGS**L**WDS**F**K**S**SK-----
 HorVul (306) KQS**S**AWH**E**SS**K**IG**I**IVSGGN**V**D**L**RVLWDS**L**Y**K**-----
 SchPom (297) KL**K**N-----KRIG**I**ISGGNV**D**IER**Y**AH**F**LS**Q**-----
 SacCer (293) EL**V**G-----KKV**G**I**I**LSGGNV**D**M**K**RYAT**L**IS**G**K**E**DGPT**I**-----

Obr. 6 Porovnání aminokyselinových sekvencí paralogů SR. Vyobrazené sekvence jsou z *Homo sapiens* (HomSap), *Mus musculus* (MusMus), *Rattus norvegicus* (RatNor), *Arabidosis thaliana* (AraTha), *Hordeum vulgare* (HorVul), *Schizocaccharomyces pombe* (SchPom) a z *Saccharomyces cerevisiae* (SacCer). Konzervované aminokyseliny jsou vyznačeny červeně na žlutém pozadí, konzervované aminokyseliny vyskutijící se v minimálně polovině sekvencí jsou vyznačeny černě na zeleném pozadí a konzervované aminokyseliny se slabě podobnými vlastnostmi jsou znázorněny modře na modrém pozadí. Černým rámečkem jsou vyznačeny aminokyseliny Lys 56, Ser 84 a Pro 111, o kterých bude v práci dále řeč. Všechny tři aminokyseliny jsou mezi těmito paralogy konzervované. Porovnání sekvencí bylo provedeno pomocí programu VectorNTI.

1.4.1. SR u rostlin

Úloha D-serinu v rostlinném organismu doposud nebyla odhalena, jisté však je, že je pro rostlinu toxický. Již 0,5 mM DS inhibuje růst rostlin, hladina DS tak musí být důsledně regulována [57]. To vede k domněnce, že hlavní fyziologická role SR v rostlině je DS odbourávat a ne syntetizovat. Všechny dosud charakterizované rostlinné SR vykazují eliminační aktivitu až dvacetinásobně převyšující aktivitu racemizační [58-59]. Vzhledem k tomu, že SR u *Arabidopsis thaliana* se nejvíce vyskytuje v meristému, lze se dohadovat, že rostlinná SR může hrát významnou roli v dodávání energie díky produkci pyruvátu.

1.4.1.1. SR dvouděložných rostlin: *Arabidopsis thaliana*

Gen kódující SR izolovaný z *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) byl rekombinantně exprimován v *E.coli*. Tato SR vykazuje 46% identitu s lidskou SR a katalyzuje jak racemizační reakce, tak i reakce eliminační a je aktivována dvojmocnými kationy, zvláště Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+} . Naopak ATP žádný vliv na aktivitu enzymu nemá [58].

1.4.1.2. SR jednoděložných rostlin: *Hordeum vulgare* a *Oryza sativa*

SR izolována z *Hordeum vulgare* (ječmen obecný) je polypeptid o 337 aminokyselinách, jehož molární hmotnost odpovídá 35,7 kDa. Její sekvence sdílí 89% identitu se sekvencí aminokyselin *Oryza sativa* (rýže setá), zatímco se zástupcem dvouděložných rostlin *A.thaliana* ji spojuje 68% identita. S lidskou SR je identita sekvencí ještě nižší, 46%. SR z ječmene a rýže katalyzují konverzi LS na DS a zpět a také LS na pyruvát. Aktivita enzymu je stejně jako u SR z *A.thaliana* ovlivněna dvojmocnými kationy jako Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+} [59]. Aktivita katalýzy se v jejich přítomnosti zvyšuje. Vliv ATP na aktivitu enzymu tak jednoznačný není. U SR z ječmene není jako SR *A.thaliana* afinita k ATP [59]. U SR z rýže ATP aktivuje eliminaci ale ne racemisaci [60]. Fylogenetické studie ukazují, že tyto SR orthology jsou rozdílné od savčí SR, stejně jako od SR z *A.thaliana* [59].

1.4.2. SR u kvasinek

1.4.2.1. SR ze *Saccharomyces cerevisiae*

Gen pravděpodobně kódující protein SR byl naklonován z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Je sekvenčně podobný s myší SR (40%). N-Konec je naopak nápadně podobný L-threo-3-hydroxyaspartát dehydratase (LTHD) z *Pseudomonas* sp. T62 [61]. Enzym, stejně jako ostatní eukaryotické SR, využívá PLP a jeho aktivita je zvýšena v přítomnosti

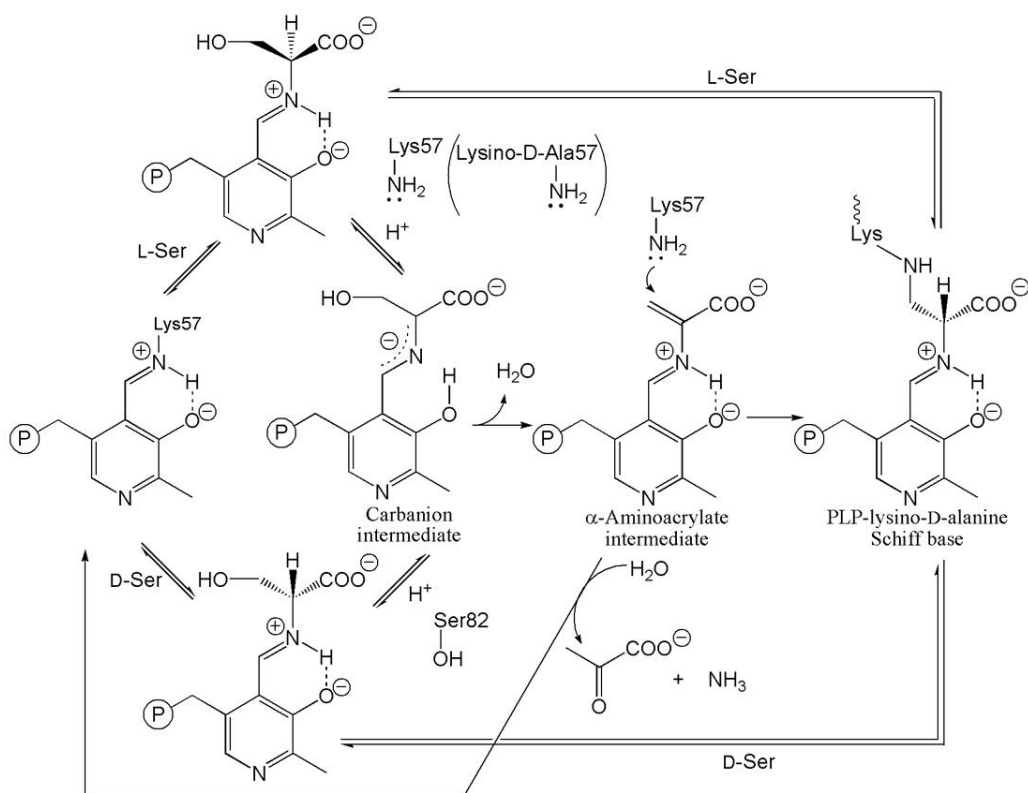
dvojmocných kationů. Tento enzym však vykazuje jen velmi slabou racemizační aktivitu, okolo 10% aktivity purifikované SR z krysího mozku [62]. Na druhou stranu byla pozorována významná dehydratasová aktivita specifická pro *L-threo*-3-hydroxyaspartát. Můžeme tedy konstatovat, že spíše než o SR se jedná o LTHD. Později se ukázalo, že myší SR je také schopna účinně přeměňovat *L-threo*-3-hydroxyaspartát [63]. Přítomnost 3-hydroxyaspartátů nebyla v savčím organismu nikdy prokázána. U myši SR se proto spíše jedná o vedlejší aktivitu.

1.4.2.2. SR ze *Schizosaccharomyces pombe*

SR této kvasinky (spSR) je zajímavá především proto, že až donedávna byla její krystalová struktura jediná vyřešená 3D struktura SR. Tento enzym má racemizační a eliminační schopnosti a jeho aktivita je zvyšována nejenom dvojmocnými kationy, ale také ATP. spSR vykazuje 35,1% homologii s lidskou SR. Jedná se o homodimer, s podjednotkou o molekulové hmotnosti okolo 35 kDa.

Do databáze 3D struktur proteinů (Protein Data Bank) byly k dnešnímu dni uloženy celkem tři spSR struktury (jedna bez ligandů, druhá s nehydrolyzovatelným analogem ATP, třetí s navázaným substrátem LS), jejich rozlišení je od 1,7 do 2,2 Å [64]. Tyto struktury potvrdily, že SR patří do skupiny II PLP-enzymů, do takzvané tryptofan synthasové rodiny. Krystalová struktura spSR je hojně využívána jako šablona pro homologní modely ostatních SR.

Tyto struktury naznačily souvislosti mezi strukturou proteinu a jeho funkcí. Tak víme, že se spSR chová jako aspartát aminotransferasy, SR má „otevřenou“ formu v nepřítomnosti substrátu a formu „uzavřenou“ ve chvíli, kdy je substrát vázán v aktivním místě. Monomerní jednotka spSR obsahuje dvě domény, velkou a malou. Po navázání ligandu se malá podjednotka natočí asi o 20°, aby uzavřela ligand v aktivním místě, které je situováno na rozhraní těchto podjednotek. Krystalové struktury také dovolily identifikovat vazná místa pro PLP, dvojmocné kationy a pro ATP. PLP vytváří Schiffovu bázi s Lys 57 (**obr. 7**, str.24). Vazné místo pro fosfátovou skupinu PLP je umístěno na tetra-glycinové smyčce (Gly 183-Gly 185-Gly 186-Gly 187). Naopak asparaginová smyčka (Ser 81-Ser 82-Gly 83-Asn 84-His 85) vytváří rozpoznávací místo pro karboxylovou skupinu substrátu. Dvojmocné kationy se nacházejí mimo aktivní místo [64-65]. Jejich role tudíž nebude spočívat v samotné katalýze, nýbrž ve stabilizaci prostorového složení proteinu. Zajímavé je, že aminokyselinové zbytky podílející se na vazbě PLP a substrátu jsou konzervované mezi všemi SR orthology.



Obr. 7 Reakční mechanismus spSR a modifikované spSR s lysino-alanylovým zbytkem v aktivním místě. Mechanismus navrhli na základě 3D struktury Goto a kol. Převzato z [64].

1.4.3. Savčí SR

Do dnešní doby bylo do databází uloženo několik genových sekvencí kódujících savčí SR, z nichž byly zatím izolovány a charakterizovány pouze tři. Jsou to SR z krysy (*Rattus norvegicus*), myši (*Mus musculus*) a také z člověka (*Homo sapiens*). Dále byly popsány dvě isoformy mRNA u psa (*Canis familiaris*). Výsledný protein je z 88% identický s lidskou SR. Dále aminokyselinová sekvence SR z krávy (*Bos taurus*) je z 85% identická s lidskou SR. Bylo také izolováno několik isoform mRNA ze šimpanze (*Pan troglodytes*) a z makaka rhesuse (*Macaca mulatta*), identita jejich vybraných aminokyselinových sekvencí je 99% a 96%, respektive. Tyto orthology lidské SR zatím nejsou příliš prostudovány.

1.4.3.1. SR z *Rattus norvegicus*

Krysí SR byla vůbec první izolovanou savčí SR [10], později byl její gen klonován a exprimován v rekombinantní formě. Bylo zjištěno, že tato SR je na C-konci zkrácena o několik aminokyselin. Její sekvence obsahuje 333 aminokyselin, zatímco lidská SR je o

sedm aminokyselin delší. Zkrácení je způsobeno „nonsense“ mutací 334. aminokyseliny. Kdyby byla nukleotidová sekvence prodloužena za 334. zbytek, krysí SR by měla karboxy-konec podobný lidskému a myšimu. Krysí SR sdílí 96% identitu primární sekvence s myší SR a 92% s lidskou SR.

1.4.3.2. SR z *Mus musculus*

Před více než deseti lety Wolosker *et al.* izolovali z cDNA gen kódující myší SR (mSR). mSR je dlouhá 339 aminokyselin a je oproti lidské SR o jeden aminokyselinový zbytek v blízkosti C-konce kratší (Ser 322). sekvence myší a lidské SR sdílí 89% identitu. Myší SR se v roztoku vyskytuje jako homodimer, jehož protomery (o molární hmotnosti 37 kDa) jsou drženy pospolu nekovalentními interakcemi. Jako všechny SR, o kterých dosud byla řeč, také tato SR potřebuje PLP jako kofaktor, je aktivována dvojmocnými kationy kovů (Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+}) a ATP. Myší SR má aktivitu jak racemizační tak eliminační. SR reverzibilně přeměňuje LS na DS, nicméně katalytická účinnost (k_{cat}/K_M) je vyšší pro reakci probíhající ve směru $\text{LS} \rightarrow \text{DS}$. Tento rozdíl se prohlubuje v případě eliminační reakce, kdy k_{cat}/K_M pro LS je několikrát vyšší než k_{cat}/K_M pro DS [63]. Vzhledem k tomu, že hodnota K_M pro eliminaci DS odpovídá K_M pro LS, je pravděpodobné, že se jedná o přeměnu LS, který vznikl z DS. Eliminační aktivita mSR je tudíž specifická pro L-enantiomer serinu.

Tab. 1 Srovnání reakční kinetiky mSR a hSR.

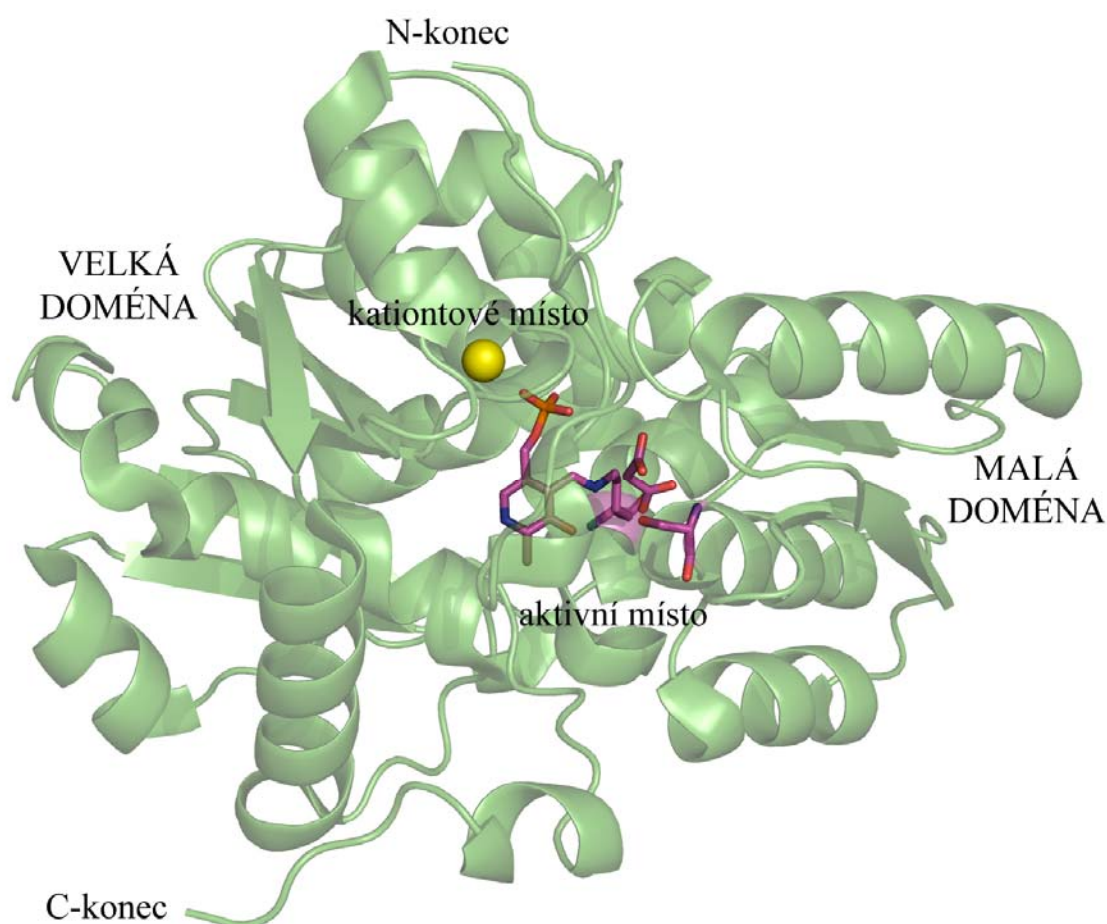
mSR	K_M [mM]	k_{cat} [min ⁻¹]	k_{cat}/K_M [min ⁻¹ .mM ⁻¹]	hSR	K_M [mM]	k_{cat} [min ⁻¹]	k_{cat}/K_M [min ⁻¹ .mM ⁻¹]
LS rac.	3,8	45,5	12,0	LS rac.	4,1	41,5	10,0
DS rac.	14,5	113	7,8	DS rac.	10,8	84,9	7,9
LS β-el.	4,0	81,3	20,3	LS β-el.	4,7	100	21,2
DS β-el.	3,2	8,8	2,7	DS β-el.	9,5	7,7	0,81

Srovnání katalytické účinnosti myšího a lidského ortologu SR pro racemizační reakci (rac.) a β-eliminační reakci (β-el.) v přítomnosti LS a DS jako substrátů. Data byla převzata z [63, 66]

1.4.3.3. SR z *Homo sapiens*

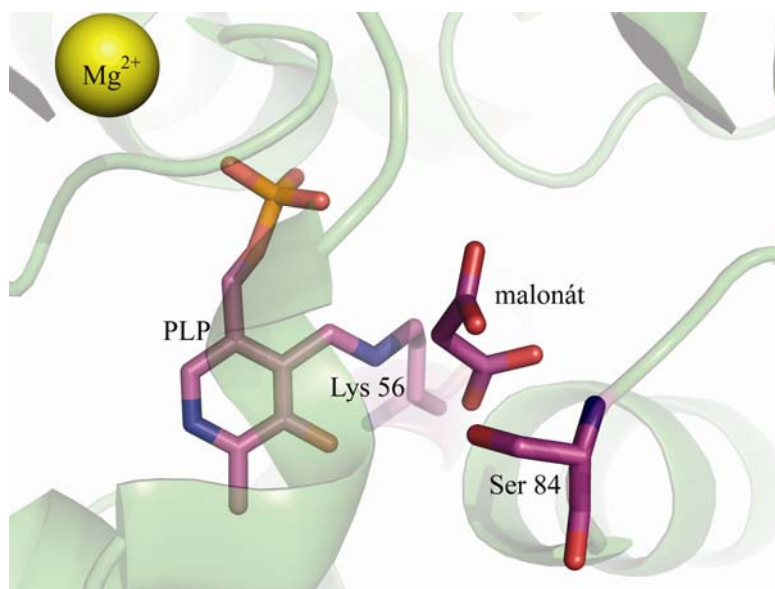
Lidská SR využívá stejné aktivátory jako myší SR. Rozdíl je patrný až v kinetických parametrech katalyzovaných reakcí (Tab. 1.). Lidská SR se skládá ze 340 aminokyselinových zbytků. Molekulová hmotnost odpovídá 36,5 kDa. Krystalové studie

potvrdily, že hSR se řadí do skupiny Fold Type II. Jedná se o globulární protein s největším zastoupením α -helixů, v menší míře pak β -listů, β -otoček a smyček [66]. Terciární struktura proteinu je tvořena dvěma doménami (**obr. 8**). Velká doména je tvořena aminokyselinovými zbytky 1-68 a 157-340, malá doména zbytky 78-155. Každá doména poskytuje aminokyselinové zbytky aktivnímu místu. Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2.2. pro PLP-enzymy, také hSR zaujímá dvě konformace, „otevřenou“, v nepřítomnosti ligandu a „zavřenou“ s navázaným ligandem v aktivním místě. Navázání ligandu vyvolá u malé domény posun asi o 20° [65]. V roztocích hSR vystupuje nejvíce jako homodimer, méně jako tetramer.



Obr. 8 Struktura hSR. Je zde vyznačená struktura jednoho monomeru (PDB kód 3L6B). V aktivním místě se nachází PLP a malonát. Jsou zde také barevně vyznačeny aminokyselinové zbytky Ser 84 a Lys 56. Kationtové místo je obsazeno Mn^{2+} , který je znázorněn jako žlutá kulička. Obrázek byl připraven v programu PyMol.

Fosfát z PLP je v aktivním místě ukotven tzv. tetraglycinovou smyčkou (Gly 185-188), Met 189, pyridinový kruh je svým dusíkem vázán na Ser 183 a 5-hydroxylová skupina interaguje s Asn 86. PLP je v klidovém stavu kovalentně vázán na Lys 56 (**obr. 8**, str.26). Dvojmocné kationy, například Mg^{2+} , a ATP jsou vázány mimo aktivní místo. Mg^{2+} je hexakoordinován v tzv. kationtovém vazném místě (**obr. 8**, str.26). Na vazbě kationu se podílí tři aminokyselinové zbytky (Glu 210, Ala 214 a Asp 216) a tři molekuly vody. Vazebné místo pro ATP bylo nedávno popsáno a ukázalo se, že je podobné vazebným místům pro ATP jiných proteinů [67].



Obr. 9 Aktivní místo hSR. Přiblížení aktivního místa hSR (PDB kód 3L6B). PLP je navázáno na Lys 56. Dále je vyznačen Ser 84 a malonát. V kationtovém místě se nachází Mg^{2+} (žlutá kulička).

Jak již bylo řečeno výše, eliminační aktivita je specifická pro LS. Je ale s podivem, že pozorujeme tak výrazné rozdíly v eliminační aktivitě enzymu v závislosti na chiralitě substrátu. Předpokládá se, že všechny reakce katalyzované SR probíhají přes společný chinoidní intermediát. Jak již bylo zmíněno v sekci 1.4.2.2., Yoshimura a Goto na základě vyřešené struktury SR z *S. pombe* navrhli reakční mechanismus SR založený na dvou katalytických bázích (viz. **obr. 9**). Jednou z bází je PLP-vázající lysinový zbytek (Lys 56), který katalyzuje abstrakci α -protonu z LS a adici α -protonu za vzniku LS. Druhá báze (Ser 84) katalyzuje abstrakci α -protonu z DS a adici α -protonu za vzniku DS. V souhře pak nejdříve Ser 84 odebere α -proton DS a Lys 56 pak katalyzuje adici za vzniku LS. Mutace Ser 84 provedená na SR z hlenky *Dictyostelium discoideum* přivodila očekávanou ztrátu schopnosti enzymu racemisovat LS a DS a také ztrátu eliminační aktivity DS. Jediná β -

eliminace LS, pro kterou není Ser 84 důležitý, byla zachována [35]. Zajímavá otázka je, zda tyto poznatky mohou být aplikovatelné na reakční mechanismus savčích SR.

2. Cíle

Tato práce si vytyčila následující cíle:

1. připravit rekombinantní lidskou serinracemasu s mutací serinu v poloze 84 za glycin
2. exprimovat a následně purifikovat tento protein
3. prostudovat enzymovou aktivitu této hSR S84G
4. analyzovat tepelnou stabilitu proteinu v přítomnosti různých aditiv
5. určit velikost hSR S84G v roztoku

3. Materiál a metody

3.1. Materiály

3.1.1. Chemikálie, média, enzymy a další použitý materiál

Bio-Rad (Hercules, USA)

agarosa, 5X Bio-Rad protein assay kit

Fluka (Švýcarsko)

akrylamid, glycerol, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin), DNPH

Lachema (Brno, ČR)

aceton, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný

Penta (Praha, ČR)

azid sodný, methanol, kyselina octová, isopropanol, ethanol, hydroxid sodný, kyselina chloristá, kyselina chlorovodíková, kyselina octová

Promega (Madison, USA)

Pfu DNA polymerasa

Qiagen (Hilden, Německo)

QIAprep Spin Miniprep Kit

Roche (Basilej, Švýcarsko)

Complete Mini EDTA free Protease inhibitor cocktail tablets

Serva (Heidelberg, Německo)

Coomassie Brilliant Blue G-250, bromfenolová modř, BSA, peroxodisíran amonný, SDS marker

Sigma-Aldrich (Buchs, Švýcarsko)

EDTA, SDS, LB Broth, LB agar, 2-merkaptoethanol, glycin, Tris, sacharosa, yeast extract, NZ amine, ATP, dodocylsulfát sodný, DTT, HEPES, PLP, L-serin, D-serin, hydroxid tetrabutylamonný (TBA), triethanolamin, NZ amin

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Marfeyho činidlo (FDAA)

Waters (Milford, USA)

Symmetry C₁₈ (4,6×250mm), částěčky náplně pro kolonu na RP-HPLC 5 µm

3.1.2. Oligonukleotidy

Primery použité na polymerasovou štěpnou reakci byly nasyntetizovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR):

S84G FOR o sekvenci 5'-CGGTCGTTACCCATTCGGGCGGTAACCATGGTCAG -3'

SG4G REV o sekvenci 5'-CTGACCATGGTTACCGCCCGAATGGGTAACGACcg-3'

Primery použité na sekvenování plasmidové DNA byly nasyntetizovány firmou Jena Bioscience (Německo):

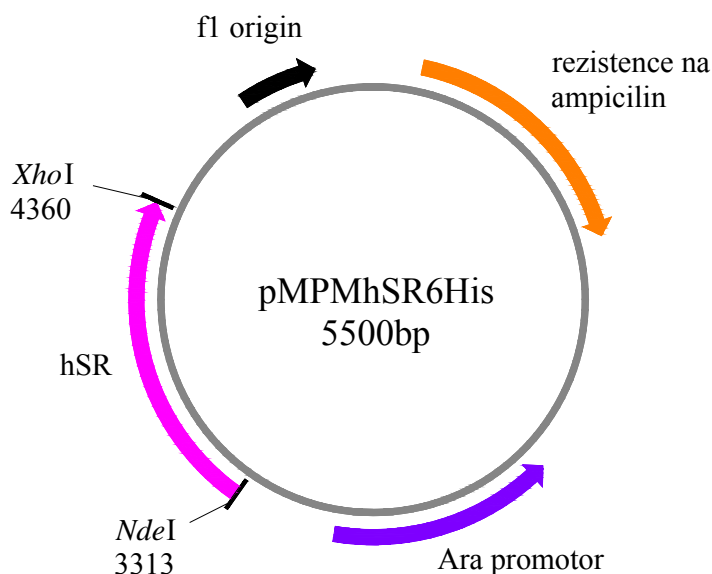
A4 SEQ FOR o sekvenci 5'-CGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTG-3'

A4 SEQ REV o sekvenci 5'-CGTTCTGATTTAATCTGTATCAGGC-3'

3.1.3. Plasmidová DNA

Plasmid pro přípravu rekombinantní hSR byl připraven tak, jak je popsáno Hoffman *et al.* [66]. Tento plasmid v sobě nese rezistenci na antibiotikum ampicilin. Plasmid dále obsahuje arabinosový (ara) operon a expresi rekombinantní hSR lze indukovat L-arabinosou. Když v médiu není přítomna arabinosa, promotor (P_{BAD}) je nepřístupný pro RNA polymerasu. Navíc tento promotor je schopný i autoregulace. Ve chvíli, kdy koncentrace arabinosy poklesne, transkripce genů potřebných pro přeměnu arabinosy se zastaví. Regulace tohoto operonu je tedy mnohem komplexnější než regulace lac operonu. Gen kódující hSR obsahuje na C-konci tzv. His značku. Tato značka se přepíše do primární

struktury proteinu jako šest po sobě jdoucích histidinů. Tato značka významně usnadňuje následnou purifikaci proteinu. Mapa plasmidu je vidět na obr. 10.



Obr. 10 Mapa plasmidu pMPMhSR6His.

3.1.4. Programy

Blast, National Center of Biotechnology Information

GraFit32, Version 5.0.11, Erithacus Software Ltd. (Horley, UK)

Image Quant, TotalLab Ltd (Newcastle, UK)

VectorNTI Advance Software, Invitrogen (Carlsbad, USA)

The PyMol Molecular Graphic System, DeLano Scientific (San Carlos, USA)

3.2. Přístroje

autokláv MLS-3020U, Sanyo (Japonsko)

centrifugy: Biofuge pico, Heraeus Instruments (Německo)

Beckman Avanti J-30I, Fullerton (USA)

Megafuge 2.0R Heraeus Instruments (Německo)

Eppendorf 5414R, Eppendorf (Německo)

horizontální agarosová elektroforéza, Gibco (USA)

chromatografický přístroj: ÄKTAprime, GE Healthcare (UK)

ÄKTAexplorer, Amersham Pharmacia Biotech (Kanada)

HPLC: přístroj Alliance HPLC High Throughput, Waters (USA)

detektor Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters (USA)

pH metr Unicam 9450 (USA)

fotoaparát SP-5000UZ, Olympus (Japonsko)

transiluminátor Electronic Dualwave Transilluminator, Ultra-Lūm (USA)

vertikální polyakrylamidová elektroforéza, Bio-Rad (USA)

laboratorní váhy: HL-400, A&D Engineering, Inc. (USA)
 EK-400, A&D Engineering, Inc. (USA)

vodní lázeň, Grant Instruments, Ltd. (UK)

rotační inkubátor Innova 4300, New Brunswick Scientific (Německo)

Light Cycler 480 Real-Time PCR, Roche (Švýcarsko)

sonikátor Soniprep 150, Sanyo (Japonsko)

spektrometr NanoDrop ND-1000, Thermo Scinetific (USA)

spektrometr Specord 210, Analytik Jena (Německo)

3.3. Metody

3.3.1. Polymerasová štěpná reakce (PCR)

Složení reakční směsi a podmínky pro PCR byly navrženy podle kitu Site-directed mutagenesis (Qiagen). Do reakce bylo pipetováno 1 μL templátové DNA (pMPMhSR6His), 5 μL pufru *Pfu* (5X), 8 μL směsi deoxyribonukleotidů (10 mM), 1 μL přímého primeru (125 ng/ μL), 1 μL zpětného primeru (125 ng/ μL), 1 μL *Pfu* polymerasy a 33 μL vody, Sekvence použitých primerů viz. 3.1.2.

Tab.2 Průběh polymerasové štěpné reakce

Počet cyklů	Teplota /°C	Délka trvání cyklu
1	95	30 s
18	95	30 s
	55	1 min
	68	11 min
1	4	uchování reakce do dalšího zpracování

Po skončení polymerasové reakce se vzorek přenesl do mikrozkušavky a do směsi bylo přidáno 1 μL DpnI. Vzorek byl inkubován po dobu 1 hodiny na vodní lázni o teplotě 37°C. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 37 μL filtrované HPLC-vody, 12 μL acetátu sodného o koncentraci 2,5 M a pH 5,2 a 250 μL studeného ethanolu. Vzorek byl ponechán v -20°C po dobu několika hodin. Precipitát byl následně stočen v mikrocentrifuze (15 min, 16000x g, 4°C) a veškerý ethanol a voda byly opatrně odebrány a peleta byla sušena na vzduchu po dobu přibližně 15 min.

3.3.2. Transformace bakterií *E. coli*

100 μL kompetentních buněk *Escherichia coli*, uchovávaných při -80°C, bylo smícháno s 1 μL plasmidové DNA a chlazeno na ledu po dobu asi 30 min na ledu. Poté byl proveden tepelný šok, kdy byly buňky vloženy na 90 s do vodní lázně o 42°C a potom okamžitě inkubovány na ledu. Po dvou minutách byla při laboratorní teplotě reakční směs zředěna 10X sterilním LB médiem bez antibiotika a transformované buňky byly inkubovány 60 min při 37°C. Mezitím byly Petriho misky (průměr 90 mm) s LB agarem obsahujícím antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace 100 $\mu\text{g/mL}$) vysušeny při 37°C. Na takto připravené misky bylo po skončení doby inkubace rozetřeno 100 μL vzorku a bakterie byly ponechány růst při 37°C přes noc (růst se provádí s miskami dnem vzhůru). Další den byly bakterie buď využity na minipreparaci plasmidové DNA nebo na inokulaci většího objemu média při expresi enzymu.

3.3.3. Minipreparace plasmidové DNA z bakterií

Jedna bakteriální kolonie byla sterilním párátkem přenesena do 12 mL LB média s ampicilinem (výsledná koncentrace 100 $\mu\text{g/mL}$) a byla inkubována při 37°C a 220 ot/min po dobu 16 hod. Bakteriální kultura byla poté centrifugována (3361x g, 10 min, 4°C) a supernatant odebrán. Izolace plasmidové DNA z pelety obsahující bakteriální buňky byla provedena podle protokolu ke „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen).

3.3.4. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas

Do 1,5 mL mikrozkušavky byla připravena následující reakční směs: 1 μL pufru NEB 3 (10X), 0,1 μL BSA, 1 μL restrikční endonukleasy BamHI, 1 μL DNA z minipreparace a 7 μL vody.

Reakční směs byla inkubována na vodní lázni při 37°C po dobu 2 hod. Po proběhnutí štěpící reakce byla směs analyzována pomocí horizontální agarosové elektroforézy.

3.3.5. Horizontální agarosová elektroforéza

Roztoky:

TAE pufr:	0,04 M Tris-acetát 1 mM EDTA upraveno na pH 8,0
vzorkový pufr:	40% (w/v) sacharosa 0,1% (w/v) bromfenolová modř 0,02% NaN ₃

DNA byla analyzována pomocí horizontální gelové elektroforézy s použitím 1% (w/v) agarosy rozpuštěné v TAE pufru a obsahující fluorescenční barvivo GelRed (v ředění 1:100 000)

Pro stanovení délky jednotlivých fragmentů DNA byl použit standard λ -DNA marker (tj. DNA bakteriofága- λ štěpená restriční endonukleasou BstEII). Elektroforéza byla prováděna při 125 V po dobu 20 – 30 minut. Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí transiluminátoru Electronic Dualwave Transilluminator a výsledky zdokumentovány fotoaparátem SP-5000UZ (Olympus).

3.3.6. Měření koncentrace a čistoty DNA

DNA, kterou jsme získali z minipreparace (viz. 3.3.3.) byla analyzována na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). 1 μ L vzorku byl vložen do měřicí cely a byla měřena absorbance při 230, 260 a 280 nm. Koncentrace ve vzorku byla vypočítána podle absorbance při 260 nm a z poměrů absorbancí se odvodila čistota připravené DNA. U čisté DNA se poměr 260/280 pohybuje kolem 1,8 a poměr 260/230 se pohybuje v rozmezí 1,8-2,2.

3.3.7. Sekvenování DNA

Pro sekvenování plasmidové DNA bylo do 200 μL zkumavky pipetováno 7 μL plasmidové DNA, 3,2 μL 1 μM daného primeru a doplněno HPLC-vodou na objem 14 μL . Sekvence použitých primerů je uvedena v oddílu 3.1.2.

Vlastní sekvenování DNA bylo provedeno RNDr. Štěpánkou Hrdou v Laboratoři sekvenace DNA (PřF UK) na sekvenátoru 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pomocí kitu „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems).

3.3.8. Příprava média pro nadprodukcí rekombinantního proteinu

Pro přípravu 0,5 L média v 2 L Erlenmayerově baňce bylo použito:

- 6 g NZ amin
- 12 g kvasinkového extraktu
- 4 mL 50% glycerolu
- 450 mL destilované vody.

Tato směs byla klávována. Do baňky bylo přidáno 50 mL sterilního roztoku 0,17 M KH_2PO_4 a 0,72 M K_2HPO_4 . Těsně před inokulací se do média přidalo 500 μL ampicilinu (výsledná koncentrace 100 $\mu\text{g/mL}$)

3.3.9. Nadprodukce rekombinantního proteinu v *E. coli* (kmen MC1061)

Buňky *E. coli* MC1061 byly transformovány plasmidem pMPMhSR6His S84G (viz 3.3). Na Petriho misky bylo nalito trochu LB média a bakterie byly opatrně smyty do připravených sterilních 50 mL zkumavek. Bakteriální suspenze byla rozdělena rovným dílem do šesti 2 L Erlenmayerových baněk (příprava viz 3.3.8.). Baňky se umístily do rotačního inkubátoru (Innova 4300, New Brunswick) při 37°C a 220 ot./min. Každou hodinu se na spektrofotometru Specord 210 (Analytik Jena, Německo) měřila optická hustota média. Až dosáhla hodnoty absorpance 0,4-0,5 byl z náhodně vybrané baňky odebrán 1 mL na analýzu směsi před indukci. Potom se do každé baňky přidalo 500 μL 1 M L-arabiny, a buněčná kultura se nechala třepat 4 hodiny. Po uplynutí této doby se média přenesla do 500 mL kyvet a stočena na rotační centrifuze (Beckman Avanti J-30I, Fullerton) při 4°C, otáčkách 5000x g po dobu 15 min. Téměř všechnen supernatant byl odlit, peleta byla ve zbývajícím supernatantu rozpuštěna a přenesena do 50 mL zkumavek. Zkumavky byly stočeny na centrifuze Megafuge 2.0R (Heraeus Instruments) při 4°C,

otáčkách 2000x g a po dobu 20 min. Po odstranění supernatantu byly pelety uskladněny v -80°C.

3.3.10. Purifikace rekombinantní hSR na Ni-NTA kolonce

Roztoky:

Pufr A: 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 1 mM MgCl₂
 20 µM PLP
 5 mM 2-merkaptoethanol, pH 8,0

Pufr B: 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 1 mM MgCl₂
 20 µM PLP
 5 mM 2-merkaptoethanol
 250 mM imidazol, pH 8,0

Pelety buněk z nárůstu byly rozpuštěny ve 130 mL lyzovacího pufru (pufr A + 4% pufru B). Bylo přidáno 1,25 mL lysozymu (20 mg/mL). Do směsi byly přidány 2 tablety proteasových inhibitorů (Roche) a za laboratorní teploty se směs nechala míchat po dobu 30 min. Pak bylo přidáno 650 µL DNAsy (2 mg/mL) a opět se směs ponechala míchat po dobu 30 min. Takto připravený roztok byl třikrát sonikován (vždy po 30 s a poté hned umístěn na led) a centrifugován na přístroji Beckman Avanti J-30I (Fullerton) při 4°C, 18000x g po dobu 15 min. Se získaným supernatantem byla provedena samotná purifikace.

Přístroj pro provádění kapalinové chromatografie ÄKTAprime (GE Healthcare) byl promyt přefiltrovanou a odvzdušněnou vodou a následně byla připojena kolonka s Ni-NTA FastFlow agarosovým nosičem (Qiagen). Kolonka byla důkladně promyta nejdříve vodou a poté převedena do pufru A. Lyzát byl nanášen na kolonu pomocí 50 mL SuperLoopu průtokem 1 mL/min. Po nanesení celého objemu lyzátu na kolonu byl z proteklého roztoku odebrán vzorek na pozdější analýzu. Kolona se začala promývat nejdříve pufrem A + 4% pufru B a to až do chvíle, kdy se hodnota absorbance při 280 nm ustálila na základní linii. Potom se zvýšilo množství pufru B na 12% a opět se čekalo na konstantní absorbanci na

základní linii. Promývalo se konstantním průtokem 1,5 mL/min a z odpadního roztoku byl odebrán vzorek na analýzu. Následně se mohlo přistoupit k eluci. Eluční gradient byl nastaven od 12% do 100% B na objem 40 mL s průtokem 2 mL/min. Vzorky z jímaných frakcí o objemu 2 mL byly později nanесeny na polyakrylamidový gel.

3.3.11. Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Roztoky:

separační 12% gel:	2,5 mL 1,5 M Tris (pH 8,8)	
	2,7 mL 44% akrylamidové směsi:	42,8 g akrylamid
		1,2 g N',N'-bisakrylamid
		56 mL destilované vody
	100 µL 10% (w/v) SDS	
	100 µL 10% (w/v) APS	
	10 µL TEMED	
	doplněno vodou na 10 mL	
zaostřovací 5% gel:	1,25 mL 1 M Tris (pH 6,8)	
	0,75 mL 44% akrylamidové směsi	
	50 µL 10% (w/v) SDS	
	50 µL 10% (w/v) APS	
	10 µL TEMED	
	doplněno vodou na 5 mL	
vzorkový pufr (6X):	3,5 mL 1 M Tris (pH 6,8)	
	3,0 mL glycerol	
	1 g SDS	
	600 µL 2-merkaptoethanol	
	1,2 g bromfenolová modř	
	doplněno vodou na 10 mL	
elektrodový pufr (5X):	15,1 g Tris	
	94 g glycerol	

5 g SDS

900 mL voda, pH 8,8 (neupravuje se)

Vzorky byly připraveny smícháním roztoku proteinu se vzorkovacím pufrém v poměru 5:1 a denaturovány dvouminutovým varem na vodní lázni.

Separace probíhala na přístroji Bio-Rad (USA) při konstantním napětí 200V po dobu přibližně 45 min.

Pro detegování proteinů byl gel obarven Coomassie Blue, jako odbarvovací roztok byla použita 10% (w/v) kyselina octová.

3.3.12. Dialýza

Dialyzační roztok: 20 mM triethanolamin hydrochlorid (TEA)
20 μ M PLP
1 mM $MgCl_2$
0,1 mM DTT
0,02% (w/v) NaN_3 , pH 7,4

Eluční frakce obsahující hSR byly dialyzovány po dobu 16 hod proti tisícínásobnému objemovému přebytku dialyzačního pufru. Dialýza probíhala při 4°C za konstantního míchání.

3.3.13. Koncentrování proteinu po purifikaci

Po skončení dialýzy byla koncentrace purifikované hSRS84G zvýšena pomocí zkumavky Centriprep[®] YM-30 od firmy Millipore, Amicon (USA). Centrifugací (3000x g, 4°C) byl objem snížen na hodnotu asi 1 mL, koncentrace proteinu byla následně ověřena stanovením podle Bradfordové (viz. níže).

3.3.14 Měření koncentrace proteinu podle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou dle Bradfordové [68] pomocí kitu „5×Bio-Rad protein Assay Kit“ (Bio-Rad, USA). Pro kalibraci byla použita koncentrační řada standardů hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentračním rozmezí 1,0 – 5,0 mg/mL; každý vzorek byl měřen v duplikátech.

3.3.15. Měření enzymové aktivity

3.3.15.1. Inkubace

Inkubační roztok: 100 mM HEPES pH 8
10 μ M PLP
1 mM MgCl_2
1 mM ATP
4 mM LS nebo 10 mM DS
5 mM DTT, pokud není uvedeno jinak
doplněno vodou na objem 90 μ L

90 μ L inkubačního roztoku bylo pipetováno do 1,5 mL mikrozkušavky a do víčka bylo přidáno 10 μ L enzymu. Pomocí krátkého stočení (10 s, do 4000 g) byl všechn roztok soustředěn do spodní části mikrozkušavky. Tyto vzorky byly umístěny do vodní lázně o teplotě 37°C. Reakce byly následně zastavena přidáním 20 μ L 1,875 M HClO_4 do víčka mikrozkušavky a reakční směs byla stočena při 13000x g po dobu 5 min. Do směsi bylo následně pipetováno ekvimolární množství 1,875 M KOH a 5 μ L 10 mM glycinu jako interního standardu. Aby se z roztoku vyloučila sůl KClO_4 , byla směs zamrzena a následně stočena při 13000x g, 5 min. Vzorky byly v triplicátech a jako kontrola byly použity stejně připravené vzorky bez enzymu.

3.3.15.2. Prekolonová derivatizace a RP-HPLC

A. Detekce aminokyselin

Vzorky byly vystaveny působení Marfeyho činidla (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid (FDAA), Pierce) při 45°C po dobu 45 min. Reakční směs byla připravena dle pokynů výrobce následovně: 10 μ L 1M KHCO_3 , 25 μ L vzorku (max. 50mM substrát v derivatizační reakci) a 50 μ L FDAA (zásobní roztok 10 mg v 1 ml acetonu). Během reakce se barva směsi přeměnila ze žluté na oranžovou. Reakce byly zastaveny přidáním 5 μ L 2 M HCl , barva roztoku se opět změnila na žlutou. Takto upravené vzorky byly 10x zředěny 50% (w/v) MeOH ve vodě a analyzovány na RP-HPLC.

Vzorky byly analyzovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) za použití chromatografického systému Waters (USA). Vzorky byly před aplikací centrifugovány (13000x g, 10 min, 4°C). Poté bylo přeneseno 400 μ L tohoto roztoku do 1,5 mL mikrozkušavek s odstředivým víčkem, které byly následně

umístěny do speciálního stojanu. Po promytí hadiček používanými pufrů (mobilní fáze A: 50 mM octan sodný pH 4,4, mobilní fáze B: čistý methanol), byla nasazena kolona (Symmetry C₁₈, 4,6 x 250 mm, rozměr částeczek náplně 5 µm, Waters, USA) a průtokem 1 mL/min, použitým během celé analýzy, byla ekvilibrována ve startovní směsi (65 % A). 50 µL vzorku bylo analyzováno po dobu 20 min pomocí gradientu: 0 – 14 min 35 % B, 14 – 18 min 98 % B, 18 – 20 min 35 % B. Průběh chromatografie byl monitorován absorbancí při 340 nm a kontrolován programem Alliance (Waters, USA).

B. Detekce pyruvátu

Vzorky byly derivatizovány pomocí roztoku 2,4-dinitrophenylhydrazinu (DNPH). Nejdříve byl zásobní roztok DNPH zředěn 10x 50% (w/v) MeOH s vodou. Reakční směs byla připravena následovně: 25 µL zředěného DNPH, 25 µL vzorku a 450 µL 50% (w/v) MeOH s vodou. Směs byla dobře promíchána a ihned analyzována. Byl použit stejný chromatografický přístroj i stejná kolona jako při detekci aminokyselin. Kolona byla průtokem 1 mL/min ekvilibrována ve startovní směsi (60% A: 50 mM tetrabutylammonium (TBA) pH 4,3 a 40% B: čistý methanol). Detektor sledoval absorbanci při 366 nm. Objem nástřiku byl opět roven 50 µL a délka eluce jednoho vzorku odpovídala 32 min. Byl nastaven následující průběh eluce: 0 – 4 min 40% B, 4 – 19 min 65% B, 19 – 24 min 98%, 24 – 32 min 40% B.

3.3.16. Analýza tepelné stability proteinu

Do 96 jamkové mikrodestičky bylo pipetováno 50 µL reakční směsi, tj. 35 µL pufru, 5 µL barvy Sypro Orange (4X) (Sigma Aldrich, Švýcarsko) a 10 µL hSR (1,0 mg/mL). Konečné složení pufru bylo 100 mM HEPES (pH 8,0) a 10 µM PLP. Do této směsi bylo přidáno buď 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT, anebo kombinace všech těchto látek. Reakce byly analyzovány na přístroji Light Cycler 480 Real-Time PCR (Roche, Švýcarsko), kde byly zahřívány z pokojové teploty na teplotu 90°C. Excitační filtr byl nastaven na 465 nm s filtr emisní na 580 nm a hodnoty fluorescence byly průběžně zaznamenávány. Data byla analyzována pomocí doprovodného softwaru a jednotlivé teploty tání byly odečteny manuálně z prvních derivací.

3.3.17. Gelová permeační chromatografie na koloně

100 µL koncentrovaného vzorku proteinu bylo aplikováno na kolonu s kombinovaným agarosovým a dextranovým nosičem Superdex 200HR 10/30 (Pharmacia,

Uppsala, Švédsko) o objemu 24 mL připojenou k chromatografickému systému ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences). Jako mobilní fáze byl použit pufr A obsahující 150 mM NaCl. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 mL/min. Délka eluce odpovídala 1,5 objemu kolony; 60 minutám. Frakce byly jímány po 2 mL. Průběh chromatografie byl monitorován a kontrolován pomocí programu UNICORN (Amersham Biosciences). Použita byla spektrofotometrická detekce při 280 a 245 nm.

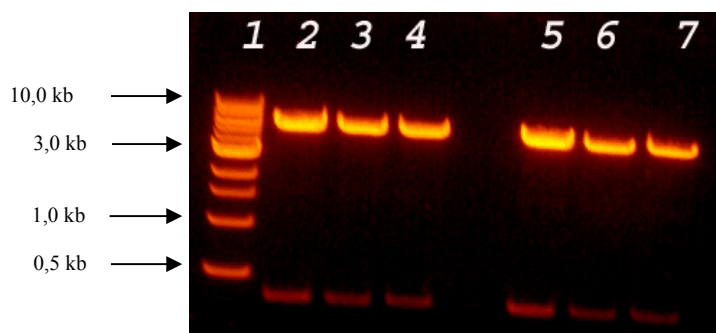
QA pufr: 20 mM TEA
 20 μ M PLP
 1 mM MgCl_2
 0,1 mM DTT
 0,02% NaN_3
 150 mM NaCl, pH upraveno na 7,0

4. Výsledky

Vzhledem k tomu, že donedávna nebyla známa krystalová struktura savčí SR, rozhodla se naše skupina použít metodu náhodných mutací lidské SR, aby získala informace o vztahu struktura – aktivita tohoto enzymu. Podařilo se připravit řadu mutantů, u nichž byla změřena enzymatická aktivita. Tři mutované formy, jejichž enzymatické aktivity se pohybovaly pod 10% aktivity hSR divokého typu (wild-type, WT), byly studovány podrobněji. Mezi mutacemi způsobující výraznou ztrátu aktivity se nacházela i mutace S84G v kombinaci s mutací P111L [69]. Zajímalo nás, jaký vliv má samostatná mutace v pozici Ser 84. Aminokyselinový zbytek Ser 84 se nachází v aktivním místě SR. Již dříve bylo navrženo Yoshimurou a kol., že tento zbytek rozhoduje o tom, zda bude substrát racemisován nebo eliminován [35]. Rozhodli jsme se tuto hypotézu ověřit, tj. zjistit, zda se nám mutací podaří změnit reakční specifitu serinracemasy tak, že bude zachována pouze DS eliminační aktivita. Připravili jsme proto rekombinantní hSR s mutací S84G. Za účelem přímého srovnání byla paralelně připravena a proměřena také WT hSR a hSR S84G/P111L.

4.1. Klonování rekombinantní hSR

Použili jsme techniku cílené jednobodové metagenese (site-directed mutagenesis). Plasmid pMPMhSR6His, připravený v naší laboratoři, posloužil jako templát pro PCR reakce. Mutovaná plasmidová DNA byla syntetizována *Pfu* polymerasou. Poté byla přidána DpnI endonukleasa, aby odstranila methylovanou DNA z templátové DNA.



Obr.11 Klonování hSR. Restrikční analýza připravených plasmidů pomocí restrikční endonukleasy BamHI. Dráha 1: λ -DNA marker, dráha 2-7: jednotlivé plasmidy izolované z šesti buněčných kolonií.

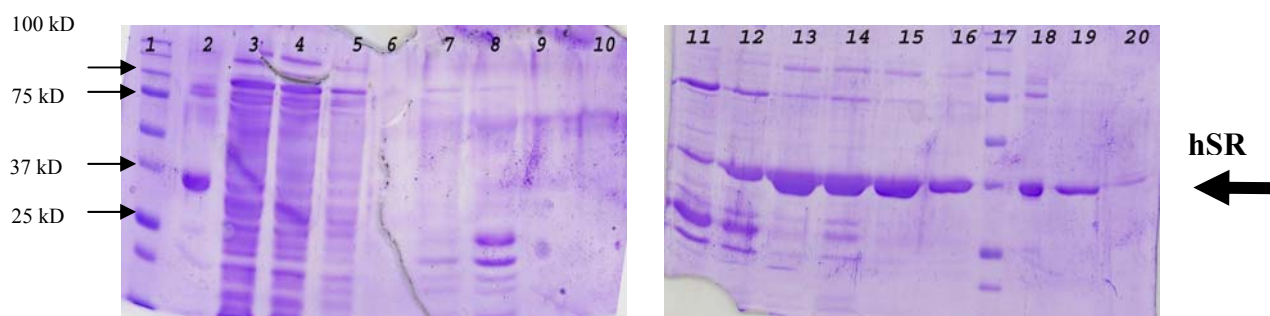
Získaným konstruktem byly dále transformovány kompetitivní buňky *E. coli* DH5 α . Odebrali jsme celkem šest kolonií, z kterých jsme následně extrahovali plasmidovou DNA. Pro usnadnění identifikace plasmidové DNA do ní bylo spolu s mutací vloženo restrikční místo pro endonukleasu BamHI. Tato restrikční endonukleasa štěpí plasmidovou DNA obsahující mutovanou hSR celkem na dvou místech. Z obrázku 11 (str. 42) je vidět, že získané plasmidy mají očekávanou délku 5,5 kbp. Identita požadovaného klonu byla ověřena sekvenací. Tato plasmidová DNA byla použita v následujících experimentech.

4.2. Nadprodukce a purifikace rekombinatní S84G hSR

Kompetitivní buňky *E. coli* kmene MC1061 byly transformovány DNA kódující hSR s mutací S84G. Z našich zkušeností plyne, že abychom získali rozpustnou SR, musí se před indukcí udržovat nízká úroveň exprese. Plasmid má proto v sobě zaklonovaný arabinosový promotor *araBAD* (viz. 3.1.3.), který brání expresi SR před indukcí arabinosou. Buňky byly indukovány během časně log fáze, tedy ve chvíli, kdy se optická hustota při 595 nm pohybuje v rozmezí 0,4 - 0,6. Na závěr byly buňky odděleny od média centrifugací a peleta byla před následnou purifikací zmrazena. Celkem jsme tak získali 25,3 g buněk z 3 L media tj. 8,43 buněk / L media.

Následovala purifikace ze supernatantu lyzovaných buněk, jak je popsáno v kapitole 3.3.10. Díky histidinové značce navázané na C-konci hSR bylo možno provést jednokrokovou afinitní chromatografii na niklové koloně. Podmínky chromatografie byly voleny podle doporučení výrobce (Quiagen, Německo). Použité pufrý obsahovaly vysoký obsah soli chloridu sodného o koncentraci 150 mM.

Protein byl eluován lineárním gradientem 30 – 250 mM imidazolu, v pH 8,0. Většina hSR byla eluována v rozmezí 100 – 180 mM imidazolu. Vzorek byl jímán do 2 ml frakcí, hSR byla na SDS-PAGE patrná v šesti až sedmi frakcích (**obr. 12**, str.44). Průběh chromatografie byl sledován pomocí měření absorbance při 280 nm a pomocí SDS-PAGE elektroforézy.



Obr.12 Purifikace rekombinantní hSR S84G buňkami *E. coli*. 12% SDS-PAGE znázorňující průběh afinitní chromatografie na koloně Ni-NTA FastFlow. Gely byly následně obarveny Coomassie Blue. Dráha 1: marker molekulové hmotnosti (MWM) (3 μ L), dráha 2: standard hSR (5 μ L), dráha 3: supernatant po lýzi buněk (vstup na kolonu) (5 μ L), dráha 4: proteklá frakce při nanášení supernatantu na kolonu (5 μ L), dráha 5: frakce po promývání kolony 12% B (5 μ L), dráha 6: peleta po lýzi buněk (5 μ L), dráha 7-10: eluční frakce E2, E5, E17 a E20 (25 μ L) v tomto pořadí, dráha 17: MWM marker (3 μ L), dráha 18: standard hSR (5 μ L), dráhy 11-16 a dráhy 19-20: eluční frakce E7 – E13 a E15. Eluční frakce E9-E13 byly spojeny a dialyzovány.

Eluční frakce obsahující hSR byly dialyzovány a následně koncentrovány. Koncentrace byla stanovenou metodou podle Bradfordové (viz. 3.3.14.). Výsledná koncentrace proteinu činila 2,1 mg/mL. Celkový výtěžek činil 0,7 mg na litr média.

4.3. Měření enzymové aktivity hSR S84G

Abychom porovnali zda mají mutace vliv na aktivitu, proměřili jsme racemizační i eliminační aktivitu všech tří forem hSR za použití LS i DS jako substrátů. Na experimenty byly použity dvě WT hSR, jedna čerstvě připravená a jedna, která byla již delší dobu uskladněna v -80°C a byla použita za stejnými účely v publikaci [69]. Již dříve jsme v laboratoři ukázali, že přítomnost redukčních činidel výrazně ovlivňuje aktivitu SR. Proměřili jsme proto aktivity s přidavkem i bez přidavku 5 mM DTT. Abychom mohli rozlišit rozdíl v aktivitě, purifikované enzymy se skladovaly v pufru s nízkou koncentrací DTT (0,1 mM).

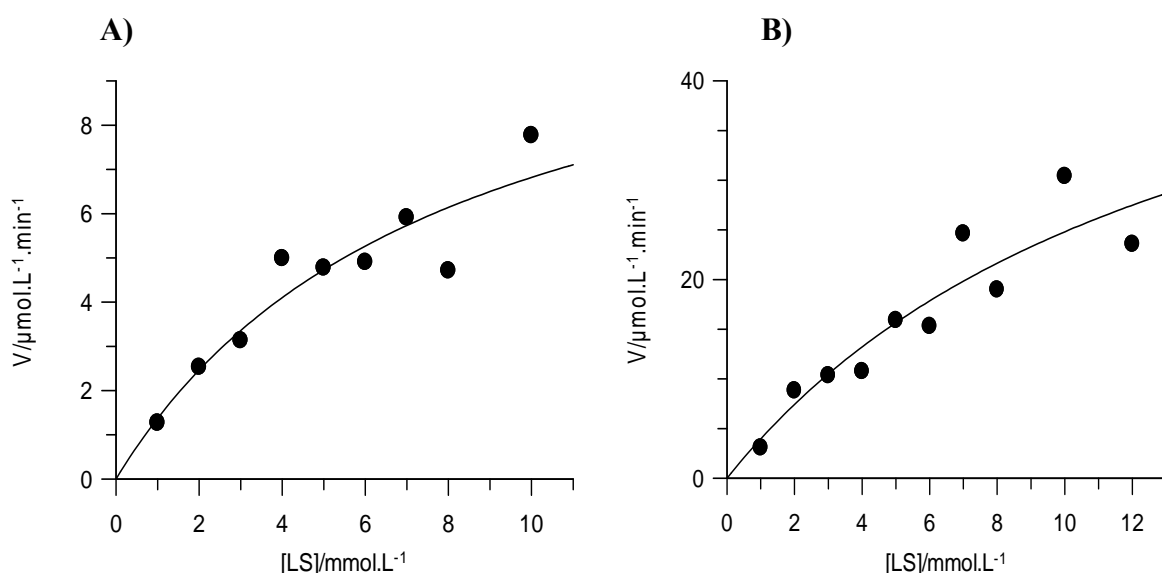
Aktivitní reakce byly měřeny v triplicátech. Byly proměřeny i vzorky bez enzymu (slepé vzorky), které byly při vyhodnocování měření použity pro odečtení pozadí, což je

důležité především v případě racemizace, neboť i opticky čisté vzorky serinu obsahují vždy stopy opačného antipodu.

Z výstupních hodnot, což jsou plochy pod vrcholy chromatogramu, jsme vypočítali specifickou aktivitu enzymu, která odpovídá množství produktu v μ molech, produkováným jedním mg enzymu za hodinu (μ mol/mg.hod). Koncentrace hSR byla vyhodnocena s ohledem na čistotu odečtenou z elektroforetického gelu.

4.3.1. Porovnání aktivity WT hSR I a II

Nejpřesnější srovnávání enzymů umožňuje měření kinetických parametrů dle Michaelis-Mentenové. Stanovili jsme proto hodnoty K_M a k_{cat} hSR wild-type (WT II) (tj. námi nově připraveného enzymu) pro konverzi LS na DS a LS na pyruvát a porovnali je s již publikovanými hodnotami pro WT hSR I, které před časem získala Hillary Hoffman a kol. v naší laboratoři. Kinetické parametry pro WT hSR II vykazují velkou chybu danou tím, že se jednalo o jediné měření. Hodnoty K_M jsou vyšší v porovnání s uveřejněnými výsledky. Hodnoty k_{cat} jsou naopak nižší, takže výsledná katalytická účinnost připravené WT hSR II je pro oba typy reakce výrazně nižší oproti publikovaným hodnotám. Proto jsme pro další srovnání aktivit mutantních a WT hSR použili obě WT serinracemasy, I i II. Jako WT hSR II je označena nově připravená SR a jako I je označena dříve připravená SR, která byla použita v publikaci [69].



Graf 1: Enzymová kinetika hSR WT II podle Michaelis-Mentenové. Všechny reakční směsi obsahovaly 100 mM HEPES (pH 8,0), 1 mM PLP, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP a 5 mM DTT. Grafy byly připraveny pomocí programu GraFit5. A) racemizační reakce LS na DS, B) eliminační reakce LS na pyruvát.

Tab. 3 Srovnání kinetických parametrů nově připravené hSR WT s publikovanými výsledky

	RACEMIZACE		β-ELIMINACE	
	hSR WT II	publikace	hSR WT II	publikace
K_M [mM]	7,9 ± 4,3	4,1 ± 0,2	13,1 ± 5,3	4,7 ± 0,4
k_{cat} [min ⁻¹]	12,4 ± 3,8	41,5 ± 1,5	57,3 ± 13,9	100 ± 5,1
k_{cat}/K_M [min ⁻¹ .mM ⁻¹]	1,6 ± 0,6	10,0 ± 0,8	4,4 ± 1,1	21,2 ± 2,7

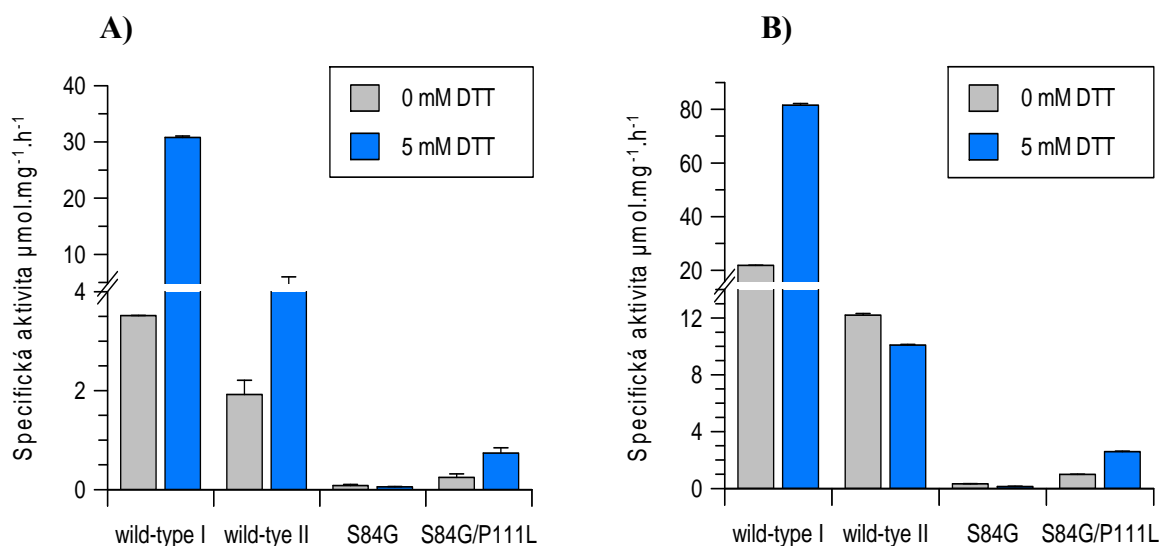
Kinetické parametry byly stanoveny pomocí nelineární regrese podle reakční kinetiky Michaelis-Mentenové v programu GraFit5.

4.3.2. Měření racemisační aktivity hSR S84G

Pro separaci a detekci L- a D-serinu jsme provedli předkolonovou derivatizaci činidlem FDAA (3.3.15.2.A). Vzniklé konjugáty enantiomerů s derivatizačním činidlem jsou diastereomery, které mají jiné fyzikální vlastnosti a můžeme je tak oddělit pomocí RP-HPLC. Na chromatogramech se LS a DS rozlišují jako dva diskrétní vrcholy vzdálené svými retenčními časy několik minut.

Z grafu 2 je vidět, že specifická aktivita mutace S84G/P111L je pod hranicí 10% specifické aktivity WT hSR I, ačkoli v porovnání s WT hSR II se tato hranice zvýší na téměř 40%.

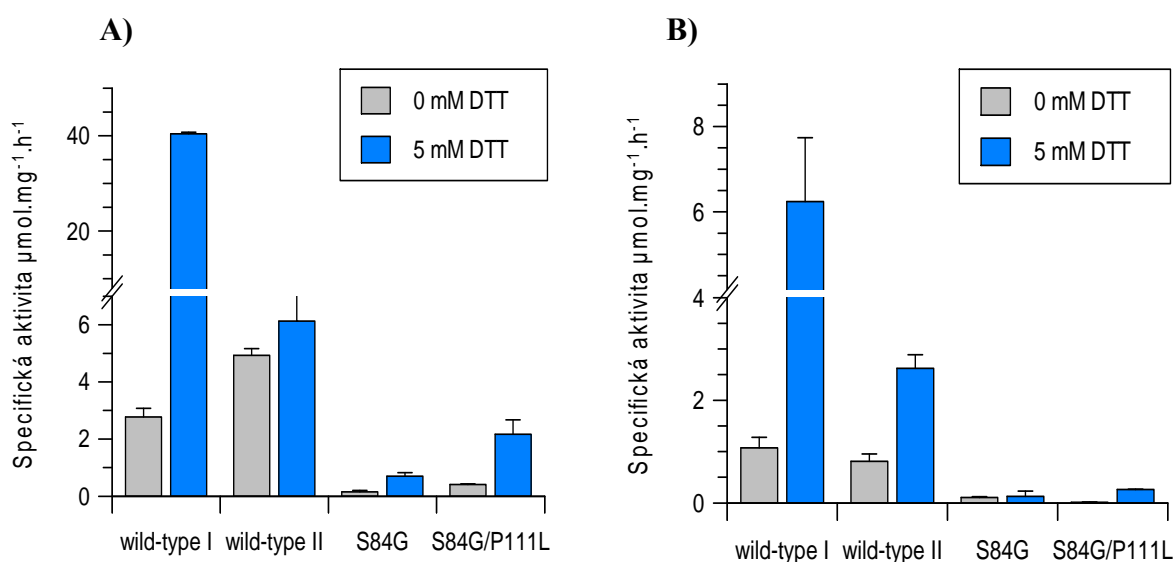
Ukázalo se, že specifická aktivita hSR S84G je nižší než specifická aktivita hSR S84G/P111L a v porovnání s WT hSR I téměř zanedbatelná. Z grafu 2 dále pozorujeme, že WT hSR I byla výrazně aktivována v přítomnosti 5 mM DTT, její aktivita se v případě konverze LS na DS zvýšila šestkrát a v případě DS na LS čtyřikrát. Aktivita hSR S84G se v přítomnosti DTT nezvýšila, avšak aktivita mutantní hSR S84G/P111L je také v přítomnosti DTT vyšší.



Graf 2: Měření specifické aktivity. Všechny reakční směsi obsahovaly 100 mM HEPES (pH 8,0), 1 mM PLP, 1 mM MgCl_2 a 1 mM ATP. Analýza byla provedena pomocí RP-HPLC metody. Specifické aktivity jsou udány v $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A) konverze LS na pyruvát, B) konverze DS na pyruvát.

4.3.3. Měření eliminační aktivity hSR S84G

Výsledky měření jsou shrnuty v grafu 3, ze kterého vidíme, že specifická aktivita eliminace LS na pyruvát mutantu S84G/P111L v přítomnosti 5 mM DTT je menší než 10% aktivity WT hSR I.



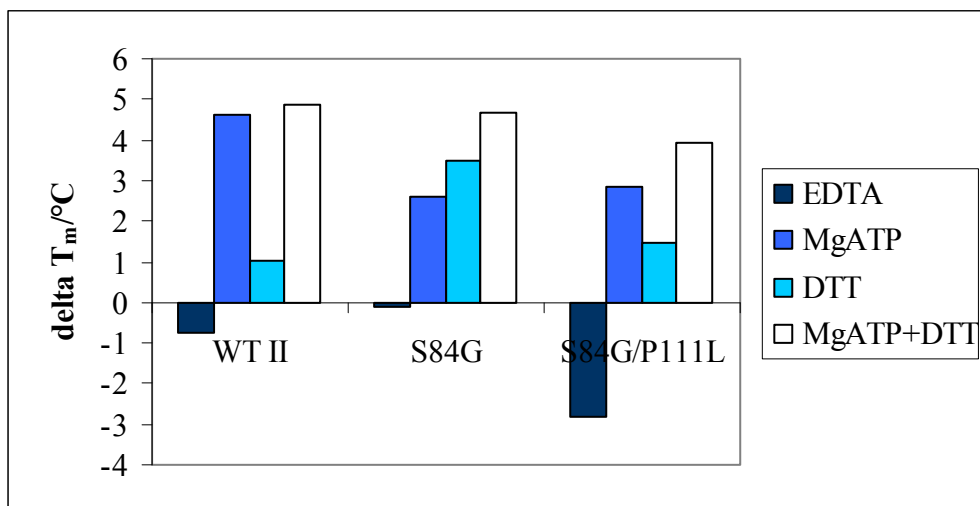
Graf 3: Měření specifické aktivity. Všechny reakční směsi obsahovaly 100 mM HEPES (pH 8,0), 1 mM PLP, 1 mM MgCl_2 a 1 mM ATP. Analýza byla provedena pomocí RP-HPLC metody. Specifické aktivity jsou udány v $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A) konverze LS na DS, B) konverze DS na LS.

V případě konverze DS nebyla specifická aktivita bez DTT detekovatelná a s DTT se aktivita pohybuje kolem 3% aktivity WT I. Specifická aktivita S84G je ve všech případech velmi nízká, téměř na hranici citlivosti použitého přístroje. Mutant S84G/P111L se při konverzi LS na pyruvát zdá být ovlivněn přidavkem 5 mM DTT podobně jako WT. Aktivita mutantu S84G zůstala po přidání DTT téměř nezměněna.

4.4. Měření tepelné stability hSR S84G

Měření tepelné stability spočívá v interkalaci fluoroforu do struktury postupně se denaturujícího proteinu se zvyšující se teplotou. Změna terciární struktury proteinu je detekována změnou fluorescence fluoroforu, uvolněného z vazby na proteinu.

V nepřítomnosti jakýchkoli aditiv měly hSR wild-type II (WT) a mutované hSR téměř shodné teploty tání: WT $59,1 \pm 0,27$; S84G $60,6 \pm 0,48$ a S84G/P111L $60,4 \pm 0,27$ °C. Z grafu 4 vidíme, že v přítomnosti známých aktivátorů hSR se tepelná stabilita zvyšuje u všech tří hSR, nejvíce však u WT hSR. S přidáním chelatačního činidla EDTA se WT hSR mírně destabilizuje, zatímco S84G se zdá být tímto činidlem neovlivněna. Naopak stabilita S84G/P111L se dramaticky snižuje. Redukční činidlo, 5mM DTT, zvyšuje teplotu tání všech forem hSR. Jejich citlivost se ale různí. Nejvíce stabilizována je S84G. Naopak nejméně na přítomnost DTT reaguje WT hSR. Dále všechny tři formy hSR vykazují vysokou stabilizaci v přítomnosti jak $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$, tak $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ v kombinaci s DTT, které zvyšuje teplotu tání nejvýrazněji. Největší rozdíl ve změně teploty tání (ΔT_m) má tak WT hSR ($4,8^\circ\text{C}$), následována S84G hSR ($4,6^\circ\text{C}$), a nejmenší rozdíl je u S84G/P111L hSR ($3,9^\circ\text{C}$).

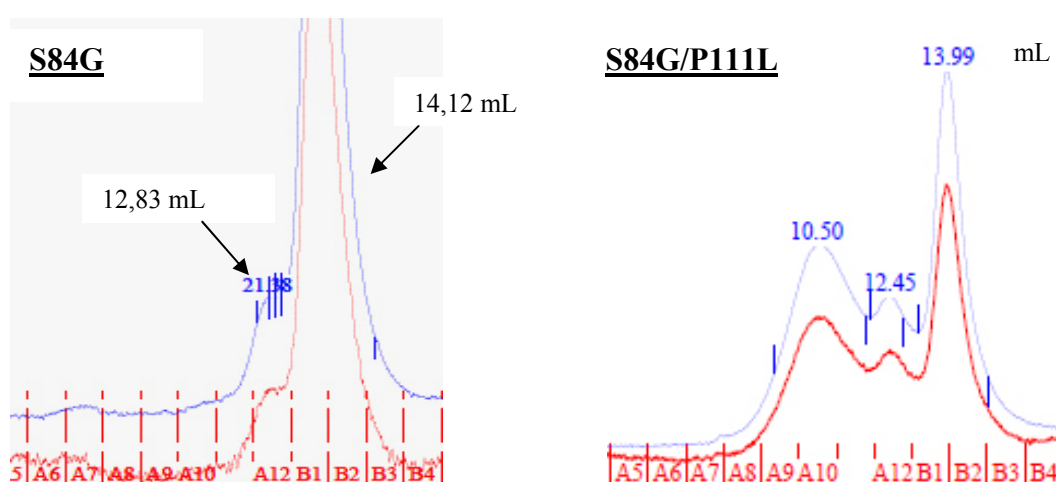


Graf 4: Změny teploty tání ($\Delta T_m/^\circ\text{C}$) v přítomnosti různých kofaktorů a aditiv.

Všechny vzorky obsahovaly 100 mM HEPES pH 8,0 a 10 μM PLP. Vzorky označené „EDTA“ obsahovaly 5 mM EDTA, „MgATP“ 1 mM MgCl_2 a 1 mM ATP a „DTT“ 5 mM DTT.

4.5. Stanovení multimerizace hSR S84G v roztoku

O SR je známo, že v roztoku tvoří funkční homodimery. Permeační gelovou chromatografií jsme chtěli ověřit, zda mutace S84G nemá za následek tvorbu větších agregátů jako S84G/P111L, která v roztoku vystupuje jako homodimer, ale může tvořit i větší celky jako jsou tetramery a oktamery [69].



Obr. 13 Porovnání chromatogramů gelové permeační chromatografie mutantů S84G a S84G/P111L.

Velikost S84G byla posouzena tak, jak je popsáno v kapitole 3.3.17. Na obrázku 13 vidíme dva vrcholy s elučními objemy 12,83 mL a 14,12 mL. Z následujícího vztahu vypočítáme poměr rozdělování enzymy mezi mobilní a stacionární fázi:

$$K_{AV} = \frac{V_R - V_M}{V_K - V_M},$$

kde V_R je eluční objem dané látky, V_M mrtvý objem kolony ($V_M = 8,02$ mL) a V_K je objem použité kolony ($V_K = 23,7$ mL). Pro výpočet molekulové hmotnosti našeho proteinu byla použita rovnice kalibrační přímky:

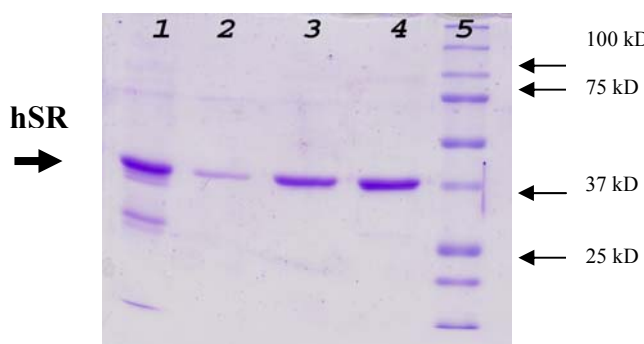
$$\log MW = -2,5081K_{AV} + 2,7609.$$

Jako kalibrační standardy byly použity následující proteiny: ferritin (440 kDa), aldolasa (158 kDa), hovězí sérový albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa) a chymotrypsinogen (25 kDa).

Tab.4 Shrnutí parametrů pro výpočet molekulové hmotnosti

V_R / mL	K_{AV}	$\log M_r$	M_r / kDa
12,83	0,3068	1,991	98,1
14,12	0,3890	1,785	61,0

Pro kontrolu, zda je ve frakcích s tímto elučním objemem přítomna S84G, byla provedena SDS-PAGE elektroforéza.



Obr. 14 Ověření přítomnosti hSR S84G ve frakcích daného elučního objemu. Dráha 1: nástřik na kolonu (10 µL), dráha 2: frakce odpovídající objemu 12,83 mL (20 µL), dráha 3 a 4: frakce s elučním objemem 14,12 mL (20 µL) a dráha 5: MWM marker (3 µL).

Můžeme tedy konstatovat, že S84G v roztoku tvoří dimery, ačkoli námi stanovená hodnota 61,0 kDa je nižší než hodnota predikovaná (74 kDa). Analýza molekulové hmotnosti dále ukazuje na tvorbu malého množství trimerů nebo tetramerů, ale v mnohem menším rozsahu než je tomu u mutantu S84G/P111L.

5. Diskuse

V teoretické části byly shrnuty dostupné informace o PLP-enzymech, aminokyselinových racemasách a o známých zástupcích eukaryotických SR. Zvláštní důraz byl kladen na již známé reakční mechanismy, jež by mohly dovolit poodhalit dosud ne zcela objasněný mechanismus katalýzy u hSR. Známé mechanismy jsou vesměs založené na teorii dvou katalytických bazí. Jednou z bazí je lysin, na kterém je v nepřítomnosti substrátu vázán PLP, a druhou bazí je taková aminokyselina, která má volný elektronový pár a je tak dobrým nukleofilem. V případě SR byl jako druhá báze předpovězen zbytek Ser 84.

V praktické části bylo naším cílem příprava rekombinantní hSR s mutací S84G, její exprese, purifikace a následná charakterizace, tj. analýza její tepelné stability, měření specifické aktivity a stanovení její velikosti v roztoku.

Úspěch klonovacího postupu a vnesení mutace S84G do genu hSR záležela hlavně na správnosti navržených primerů. Správnost byla jasně ověřena pomocí sekvenování. Díky histidinové značce na C-konci hSR S84G byl postup purifikace značně ulehčen. Jednokroková purifikace je prováděna pomocí afinitní chromatografie na koloně naplněné Ni-NTA agarosovým nosičem. Analýza purifikované hSR S84G ukázala, že protein byl získán v 70% čistotě. Na Ni-NTA koloně se mohou afinitně vázat i proteiny *E.coli*, které na svém konci nesou dostatečný počet histidinů k zachycení na nosiči. Tento jev se snažíme omezit promýváním kolony. Po spojení a dialyzaci frakcí obsahujících hSR S84G jsme koncentraci určili pomocí stanovení podle Bradfordové.. Pro určení relativní čistoty připraveného preparátu jsme provedli densitometrické stanovení příslušných elektroforeogramů. Koncentrace purifikovaného enzymu hSR S84G byla dostačující pro provádění dalších experimentů.

Specifická aktivita hSR s mutací S84G se ve všech čtyřech studovaných případech ukázala být velmi nízká. Aminokyselinový zbytek Ser 84 je klíčový pro enzymovou aktivitu hSR. Goto a kol. [64] připravili mutaci *Schizocchromyces Pombe* S82A (Ser 82 odpovídá Ser 84 u hSR), která ztratila schopnost jak racemizace LS a DS, tak schopnost konvertovat DS na pyruvát, ale dehydratasová aktivita pro LS zůstala zachována a činila asi 50% aktivity enzymu divokého typu. Přímé srovnání těchto dvou mutací však nelze provést. Mutace serinu za alanin je totiž odlišná od mutace za glycin. Glycin je menší

aminokyselina a může v aktivním místě způsobit větší strukturní změny než alanin. Je možné, že proto pozorujeme rozdíly ve specifických aktivitách. Není ale vyloučeno, že i přes vysokou strukturní podobnost hSR a kvasinkové SR se jejich reakční mechanismy mohou lišit. Proto se musíme dál snažit studovat mechanismus reakce, ať mutagenézí či pokusy o krystalizaci se substrátem v aktivním místě.

Při srovnávání aktivit nemutovaných forem hSR (WT hSR) jsme narazili na skutečnost, že specifická aktivita nově připravené rekombinantní WT hSR (označené v této bakalářské práci jak WThSR II) byla výrazně nižší než aktivita téhož publikovaného rekombinantního proteinu, připraveného před časem v naší laboratoři Hillary Hoffman (označená jako WT hSR I). V tuto chvíli není jasné, co je příčinou této diskrepance. Příčina této nedostatečné aktivity možná tkví v purifikačním procesu. Histidinová značka může mít za následek špatné sbalení proteinu, které následně ovlivní stabilitu proteinu. Můžeme spekulovat o nižší stabilitě rekombinantního proteinu, o nečistotách v jednotlivých preparátech, které mohou ovlivňovat aktivitu enzymu, ale k úplnému objasnění tohoto problému bude zapotřebí dalších experimentů.

Analýza tepelné stability enzymu hSR a jeho dvou mutací potvrdila několik známých skutečností. Přidáním chelatačního činidla do reakční směsi mělo za následek destabilizaci u všech tří proteinů. To poukazuje na to, že EDTA vytváří komplex s dvojmocným kationem již vázaným ve struktuře enzymu. Paralelně jsme ukázali, že přídavek $MgCl_2$ a ATP výrazně enzymy stabilizoval. Když se přidá pouze ATP, vyvolá pouze nepatrný stabilizační efekt (nepublikované výsledky). Dvojmocné kationy tudíž působí na hSR stabilizačním efektem.

Nejvíce byly enzymy stabilizovány v přítomnosti všech kofaktorů Mg^{2+} , ATP i redukčního činidla DTT. Tento jev potvrzuje správnost předchozího rozhodnutí přidávat tato aditiva do reakčních směsí při měření enzymatických aktivit.

Měření tepelné stability pro WT II proběhlo za stejných reakčních podmínek jako pro WT I. Konstatujeme, že oproti publikovaným výsledkům [69] se absolutní teplota denaturace WT II liší o 4°C. hSR WT II má tak sníženou tepelnou stabilitu a zda tento jev má dopad na enzymovou aktivitu bude předmětem dalšího zkoumání.

Všechny tři enzymy byly stabilizovány přidáním redukčního činidla. Nejvíce byla stabilizace patrná u hSR S84G. O hSR je známo, že obsahuje osm cysteinových zbytků v monomeru, z toho pět cysteinů je lokalizováno na povrchu proteinu. Zatím se nepotvrdilo, že by hSR měla ve své nativní konformaci disulfidické můstky. Je možné, že redukované cysteinové zbytky na povrchu pomáhají k celkové stabilizaci proteinu.

Analýza gelovou permeační chromatografií ukázala, že hSR s mutací S84G je v roztoku schopna tvořit homodimery a v menší míře i větší celky jako jsou tetrametry, stejně jako WT hSR. Tento výsledek ukazuje, že v mutantu S84G/P111L se na agregaci monomeru do vyšších celků podílí mutace P111L spíše než S84G.

6. Závěr

- Byly shrnuty dostupné informace o enzymech využívajících PLP, poznatky o studiu racemas a byly porovnány jednotlivé paralogy a orthology lidské serinracemasy.
- Mutace serinu v poloze 84 za glycin byla úspěšně vnesena do genu kódujícího lidskou serinracemasu. Tato SR byla následně exprimována a purifikována.
- Byla exprimována a purifikována serinracemasa divokého typu (WT hSR II) a mutovaná hSR S84G/P111L.
- Byl přeměřen vliv redukčního činidla DTT a aktivátorů Mg^{2+} a ATP na tepelnou stabilitu lidské serinracemasy i na stabilitu jejích mutovaných variant. Vliv na DTT a aktivátorů na hSR S84G byl stanoven v této práci poprvé.
- Bylo zjištěno, že lidská serinracemasa s mutací S84G má takřka nulovou racemisační i dehydratasovou aktivitu pro oba substráty, L-serin a D-serin. Toto pozorování potvrzuje, že Ser 84 je klíčovým zbytkem pro aktivitu SR a naznačuje, že mutace P111L v hSR mutantu S84G/P111L částečně kompenzuje ztrátu aktivity způsobenou mutací S84G.
- Lidská serinracemasa S84G se v roztoku vyskytuje nejvíce jako homodimer se stopami tetrameru. Tímto pozorováním bylo zjištěno, že mutace S84G nemá vliv na změnu multimerního stavu hSR popsanou u mutantu S84G/P111L.

7. Seznam použité literatury

- [1] Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*. 1988;241:835-7.
- [2] Hashimoto A, Nishikawa T, Konno R, Niwa A, Yasumura Y, Oka T, Takahashi K. Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Neurosci Lett*. 1993;152:33-6.
- [3] Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A. The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;141:27-32.
- [4] Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K. The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett*. 1992;296:33-6.
- [5] Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3948-52.
- [6] Rebola N, Srikumar BN, Mulle C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol*. 2010;588:93-9.
- [7] Fadda E, Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology*. 1988;27:1183-5.
- [8] Srinivasan NG, Corrigan JJ, Meister A. Biosynthesis of D-Serine in the Silkworm, *Bombyx Mori*. *J Biol Chem*. 1965;240:796-800.
- [9] Uo T, Yoshimura T, Shimizu S, Esaki N. Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;246:31-4.
- [10] Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO, Jr., Ferris CD, Snyder SH. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:721-5.
- [11] Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13409-14.
- [12] De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H. Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14542-7.
- [13] Kartvelishvily E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H. Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*. 2006;281:14151-62.
- [14] Kim PM, Aizawa H, Kim PS, Huang AS, Wickramasinghe SR, Kashani AH, Barrow RK, Haganir RL, Ghosh A, Snyder SH. Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2105-10.
- [15] Dumin E, Bendikov I, Foltyn VN, Misumi Y, Ikehara Y, Kartvelishvily E, Wolosker H. Modulation of D-serine levels via ubiquitin-dependent proteasomal degradation of serine racemase. *J Biol Chem*. 2006;281:20291-302.
- [16] Fujii K, Maeda K, Hikida T, Mustafa AK, Balkissoon R, Xia J, Yamada T, Ozeki Y, Kawahara R, Okawa M, Haganir RL, Ujike H, Snyder SH, Sawa A. Serine racemase binds to PICK1: potential relevance to schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006;11:150-7.
- [17] Konno R. Rat cerebral serine racemase: amino acid deletion and truncation at carboxy terminus. *Neurosci Lett*. 2003;349:111-4.

- [18] Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci.* 2002;5 Suppl:1039-42.
- [19] Lipton SA. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J Alzheimers Dis.* 2004;6:S61-74.
- [20] Coyle JT, Tsai G, Goff D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1003:318-27.
- [21] Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai K, Iyo M. Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2003;60:572-6.
- [22] Hashimoto K, Engberg G, Shimizu E, Nordin C, Lindstrom LH, Iyo M. Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005;29:767-9.
- [23] Bendikov I, Nadri C, Amar S, Panizzutti R, De Miranda J, Wolosker H, Agam G. A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2007;90:41-51.
- [24] Wu SZ, Bodles AM, Porter MM, Griffin WS, Basile AS, Barger SW. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *J Neuroinflammation.* 2004;1:2.
- [25] Inoue R, Hashimoto K, Harai T, Mori H. NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. *J Neurosci.* 2008;28:14486-91.
- [26] Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 2007;26:4149-59.
- [27] Webb EC. *Enzyme Nomenclature 1992, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.* Orlando: Academic Press; 1992.
- [28] Christen P, Mehta PK. From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem Rec.* 2001;1:436-47.
- [29] Mehta PK, Christen P. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 2000;74:129-84.
- [30] Alexander FW, Sandmeier E, Mehta PK, Christen P. Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families. *Eur J Biochem.* 1994;219:953-60.
- [31] Jansonius JN. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8:759-69.
- [32] Percudani R, Peracchi A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:273.
- [33] Hyde CC, Ahmed SA, Padlan EA, Miles EW, Davies DR. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* 1988;263:17857-71.
- [34] Sugio S, Petsko GA, Manning JM, Soda K, Ringe D. Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry.* 1995;34:9661-9.
- [35] Yoshimura T, Goto M. D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *FEBS J.* 2008;275:3527-37.
- [36] Toney MD. Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433:279-87.

- [37] Perault AM, Pullman B. [Electronic structure and mode of action of folic acid antimetabolites.]. *Biochim Biophys Acta*. 1961;52:266-80.
- [38] Dunathan HC. Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966;55:712-6.
- [39] Shaw JP, Petsko GA, Ringe D. Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*. 1997;36:1329-42.
- [40] Kochhar S, Christen P. Mechanism of racemization of amino acids by aspartate aminotransferase. *Eur J Biochem*. 1992;203:563-9.
- [41] Walsh CT. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J Biol Chem*. 1989;264:2393-6.
- [42] http://www.genome.ad.jp/kegg/catalog/org_list.html.
- [43] Uo T, Yoshimura T, Tanaka N, Takegawa K, Esaki N. Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J Bacteriol*. 2001;183:2226-33.
- [44] Morollo AA, Petsko GA, Ringe D. Structure of a Michaelis complex analogue: propionate binds in the substrate carboxylate site of alanine racemase. *Biochemistry*. 1999;38:3293-301.
- [45] Watanabe A, Kurokawa Y, Yoshimura T, Kurihara T, Soda K, Esaki N. Role of lysine 39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate. Chemical rescue studies of Lys39 --> Ala mutant. *J Biol Chem*. 1999;274:4189-94.
- [46] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, Esaki N. Tyrosine 265 of alanine racemase serves as a base abstracting alpha-hydrogen from L-alanine: the counterpart residue to lysine 39 specific to D-alanine. *J Biochem*. 1999;126:781-6.
- [47] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, Hayashi H, Kagamiyama H, Esaki N. Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: x-ray crystallographic studies of the enzyme bound with N-(5'-phosphopyridoxyl)alanine. *J Biol Chem*. 2002;277:19166-72.
- [48] Yoshimura T, Esaki N. Amino acid racemases: functions and mechanisms. *J Biosci Bioeng*. 2003;96:103-9.
- [49] Daigo T. Studies on the constituents of *Chondria armata*. II. Isolation of an anthelmintical constituent. *Yakugaku-zasshi*. 1959;79.
- [50] Shibata K, Watanabe T, Yoshikawa H, Abe K, Takahashi S, Kera Y, Yamada RH. Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2003;134:307-14.
- [51] Yamada Y, Fujimura T, Takahashi S, Takeuchi T, Takazawa Y, Kitamura T. Tubulovillous adenoma developing after urinary reconstruction using ileal segments. *Int J Urol*. 2006;13:1134-5.
- [52] Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H, Snyder SH. Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:3175-9.
- [53] Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8:943-50.
- [54] Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol*. 1996;4:401-7.
- [55] Arias CA, Martin-Martinez M, Blundell TL, Arthur M, Courvalin P, Reynolds PE. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol*. 1999;31:1653-64.
- [56] Ohnishi M, Saito M, Wakabayashi S, Ishizuka M, Nishimura K, Nagata Y, Kasai S. Purification and characterization of serine racemase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*. *J Bacteriol*. 2008;190:1359-65.

- [57] Erikson O, Hertzberg M, Nasholm T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol.* 2004;22:455-8.
- [58] Fujitani Y, Nakajima N, Ishihara K, Oikawa T, Ito K, Sugimoto M. Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* 2006;67:668-74.
- [59] Fujitani Y, Horiuchi T, Ito K, Sugimoto M. Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. *Phytochemistry.* 2007;68:1530-6.
- [60] Gogami Y, Ito K, Kamitani Y, Matsushima Y, Oikawa T. Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry.* 2009;70:380-7.
- [61] Wada M, Matsumoto T, Nakamori S, Sakamoto M, Kataoka M, Liu JQ, Itoh N, Yamada H, Shimizu S. Purification and characterization of a novel enzyme, L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase, from *Pseudomonas* sp. T62. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;179:147-51.
- [62] Wada M, Nakamori S, Takagi H. Serine racemase homologue of *Saccharomyces cerevisiae* has L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;225:189-93.
- [63] Strisovsky K, Jiraskova J, Mikulova A, Rulisek L, Konvalinka J. Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity dicarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. *Biochemistry.* 2005;44:13091-100.
- [64] Goto M, Yamauchi T, Kamiya N, Miyahara I, Yoshimura T, Mihara H, Kurihara T, Hirotsu K, Esaki N. Crystal structure of a homolog of mammalian serine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 2009;284:25944-52.
- [65] Yamauchi T, Goto M, Wu HY, Uo T, Yoshimura T, Mihara H, Kurihara T, Miyahara I, Hirotsu K, Esaki N. Serine racemase with catalytically active lysinoalanyl residue. *J Biochem.* 2009;145:421-4.
- [66] Hoffman HE, Jiraskova J, Ingr M, Zvelebil M, Konvalinka J. Recombinant human serine racemase: enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog. *Protein Expr Purif.* 2009;63:62-7.
- [67] Jiraskova J. Mammalian Serine Racemase as a Pharmaceutical Target: Dissertation thesis PŘF UK Praha, katedra biochemie 2010.
- [68] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [69] Hoffman H, Jiraskova J, Zvelebil M, Konvalinka J. Random mutagenesis of human serine racemase reveals residues important for the enzymatic activity. *Collect Czech Chem Commun.* 2010;75:59-79.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedená evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka